

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ
(підпис)

« ____ » _____ 2020р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Біотехнологія одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БЕ-61

Демченко Ксенія Олегівна _____

Керівник:

асист., к.т.н.,

Зубченко Людмила Сергіївна _____

Консультант з проектування:

проф., д.т.н, проф.,

Саблій Лариса Андріївна _____

Рецензент:

д.б.н., проф.,

Горчаков Володимир Юрійович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному проєкті немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ
(підпис) (ім'я , прізвище)

«__» _____ 2020р.

**ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студентці
Демченко Ксенії Олегівні**

1. Тема проєкту «Біотехнологія одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля»

керівник проєкту к.т.н., асист. Зубченко Людмила Сергіївна,

затверджені наказом по університету від,

затверджені наказом по університету від «__» _____ 20__ р. № _____

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту:

Ферментер для отримання біомаси дріжджів, об'єм ферментера 63 м³, коефіцієнт заповнення 0,7, механічне перемішування, інтенсивність барботування 60 кг/год.

4. Зміст пояснювальної записки:

Характеристика та обґрунтування вибору виду дріжджів у якості біологічного агенту; обґрунтування технології культивування та виділення ліпідів з дріжджових грибів для виробництва біодизеля; біохімічні основи технологічного процесу одержання ліпідів; технологічна частина: вибір, розрахунок та характеристика обладнання для культивування дріжджів для виробництва біодизеля; охорона праці та охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо):

Технологічна схема біотехнології одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля (А1); апаратурна схема одержання ліпідів дріжджових грибів для виробництва біодизеля (А1); креслення виробничого ферментера (А1).

6. Консультанти розділів проекту*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Графічна частина дипломного проекту	д.т.н., проф. Саблій Л.А.		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ	10.05.2020	
2	Розділ 1	15.05.2020	
3	Розділ 2	20.05.2020	
4	Розділ 3	25.05.2020	
5	Розділ 4	27.05.2020	
6	Розділ 5	27.05.2020	
7	Висновки	30.05.2020	
8	Креслення	30.05.2020	

Студент _____ Ксенія ДЕМЧЕНКО
(підпис)

Керівник проекту _____ Людмила ЗУБЧЕНКО
(підпис)

* Консультантом не може бути зазначено керівника дипломного проекту.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 81 с., 5 рис., 10 табл., 57 посилань.

У дипломному проекті наведено характеристику дріжджових грибів у якості потенційних продуцентів ліпідів та обґрунтовано вибір виду *Y. lipolytica* у якості продуцента. Проведено пошук та вибір оптимальних умов, режиму та параметрів культивування біомаси дріжджів, а також ефективних методів виділення ліпідів з метою виробництва біодизеля.

Представлено та описано технологію виробництва біодизеля з дріжджової біомаси. Для даної технології створено технологічну та апаратурну схеми. Проведено розрахунки обладнання для виробництва ліпідів дріжджових грибів. На підставі розрахунків виконано креслення виробничого ферментера. Розраховано матеріальний баланс, вказано сировину та напівпродукти, параметри контролю, та описано заходи щодо охорони праці і довкілля.

БІОДИЗЕЛЬ, ДРІЖДЖОВІ ГРИБИ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПЕРІОДИЧНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ФЕРМЕНТЕР, БІОЕНЕРГЕТИКА, ЛІПІДИ.

ABSTRACT

Explanatory note: 81 pp., 5 figs., 10 tables, 57 references.

The diploma project characterizes yeast fungi as potential lipid producers and substantiates the choice of *Y. lipolytica* species as a producer. The search and selection of optimal conditions, mode and parameters of yeast biomass cultivation was done, as well as effective methods of lipid extraction for the biodiesel production.

The technology of biodiesel production from yeast biomass is presented and described. Technological and hardware schemes are created according to this technology. Calculations of required equipment for the production of lipids of yeast fungi were done. On the basis of calculations the drawing of a production fermenter was developed. The material balance was calculated, raw materials and intermediate products, control parameters are indicated, and measures on labor and environmental protection were described.

BIODIESEL, YEAST FUNGI, BIOTECHNOLOGY, FED-BATCH FERMENTATION, BIOREACTOR, BIOENERGY, LIPIDS.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ.....	11
1.1 Характеристика та переваги дріжджових грибів в якості продуцента ліпідів для виробництва біодизеля.....	11
1.1.1 Характеристика та перспективи використання дріжджових грибів у енергетиці	11
1.1.2. Обґрунтування вибору виду дріжджових грибів для отримання біодизельного пального	15
1.2. Обґрунтування вибору технології культивування дріжджів <i>Y.lipolytica</i> з метою отримання ліпідів для виробництва біодизеля	19
1.2.1. Характеристика технології культивування дріжджів <i>Y.lipolytica</i> з метою отримання ліпідів та подальшим виробництвом біодизеля.....	19
1.2.2. Характеристика поживного середовища для культивування дріжджів <i>Y.lipolytica</i>	21
1.2.3. Вплив режиму та умов культивування на ріст дріжджів <i>Y. lipolytica</i> та вихід цільового продукту.....	25
1.3. Методи виділення ліпідів з дріжджів <i>Y.lipolytica</i>	30
1.4. Вибір каталізатора для реакції трансестерифікації	35
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ПРОЦЕСУ ВИРОНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ <i>Y.lipolytica</i>	39
2.1. Метаболізм ліпідів у дріжджів <i>Y.lipolytica</i>	39
2.1. Характеристика готового продукту дріжджів <i>Y. lipolytica</i>	41
РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	44
3.1. Сировина і матеріали	44

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.	Демченко К.				ЗМІСТ				Літ.	Арк.	Аркушів		
Конс..											6	81	
Реценз.									КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ				
Керівн.	Зубченко Л.С.												
Затверд.													

3.2. Опис технологічного процесу виробництва дріжджових ліпідів з подальшим отриманням біодизеля.....	46
3.3. Матеріальний баланс.....	54
3.4. Контроль виробництва.....	56
РОЗДІЛ 4 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖОВИХ ГРИБІВ.....	
4.1. Обґрунтування вибору виробничого ферментера.....	60
4.1. Розрахунок виробничого ферментера.....	63
4.1.1. Конструктивний розрахунок.....	63
4.1.2. Розрахунок виробничої потужності.....	66
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	68
ВИСНОВКИ.....	72
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	73
ДОДАТКИ.....	80

ВСТУП

Зростання людського населення у світі та розвиток промисловості є основними чинниками збільшення світового попиту на енергію. Незважаючи на занепокоєння щодо скорочення запасів викопного палива, найважливішим питанням є їх споживання та негативний вплив на навколишнє середовище, особливо на глобальні зміни клімату через величезні викиди парникових газів. Більше того, енергетичну безпеку та ціну на нафту можна назвати іншими проблемами, з якими стикаються країни, які в першу чергу покладаються на викопні види палива.

Постановка проблеми. Зростаючі ціни на традиційні види палива та постійне зменшення кількості їх запасів спричиняють всесвітню енергетичну кризу. На даний час інвестиції у біоенергетику є основною тенденцією розвитку паливного ринку, що має стати фундаментом для початку нової ери енергетики задля вирішення даних проблем.

Широко прийнято, що біопаливо здатне пом'якшити згадані проблеми щодо викопного палива із забезпеченням стійкого енергоресурсу. Біопаливо – це енергетично багаті хімічні речовини, що утворюються в результаті хімічної або біохімічної конверсії в основному з біомаси, такої як рослини, а також рослинні, сільськогосподарські, побутові та промислові відходи. Цей процес має переваги через поновлювальну природу біомаси. Виробництво біопалива, особливо рідкого біопалива, такого як біодизель, все більше враховується в тенденціях розвитку транспортної галузі. Проте традиційна технологія виготовлення біодизеля з олійних рослин має ряд недоліків. Низька урожайність технічних олійних культур та конкуренція між галузями біоенергетики та харчової промисловості за сировинну базу та площі для вирощування виявились вагомими перепонами на шляху розвитку

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Демченко К.						
Конс..							8	81
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Зубченко Л.С.						
Затверд.								

біодизельного виробництва.

Актуальність. На даний час біодизель широко використовується як альтернатива нафті. За оцінками експертів це біопаливо до 2050 року буде домінувати на ринку палив автомобілів і важких транспортних засобів. Роль мікроорганізмів (МО) у виробництві стійких біопалив є значною. МО, такі як бактерії, гриби та мікроводорості, мають велике метаболічне різноманіття, що дає їм змогу використовувати різні субстрати, широкий спектр джерел вуглецю від CO₂ до лігноцелюлозних сполук, які метаболізуються до речовин, які використовуються як основна сировина для виробництва біопалива. Крім того, багато МО можуть також використовуватися безпосередньо як вихідна сировина для виробництва біопалива.

Також, використання саме дріжджів в якості сировини, дозволяє уникнути проблеми конкуренції з сільськогосподарською промисловістю (на відміну від використання ріпаку, соняшника, та інших рослин в якості сировини для отримання олії). Виробництво біопалива у закритих системах культивування (ферментерах) з використанням мікробної біомаси є більш вигідним порівняно з рослинною біомасою з точки зору незалежності від природнього освітлення та умови росту на культивування.

Мета роботи. Метою роботи є розробка технології виробництва дріжджових ліпідів як сировини для одержання біодизельного палива.

Об'єкт дослідження. Процес виробництва дріжджових ліпідів для одержання біодизельного палива.

Предмет дослідження. Оптимальні параметри культивування дріжджів для виробництва ліпідів.

Для досягнення мети передбачено виконання таких завдань:

1. провести літературний огляд існуючих видів дріжджів з точки зору можливості їх використання у якості продуцента ліпідів; провести огляд технологій виробництва біодизеля та шляхів використання корисних побічних продуктів;

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						9
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2. обґрунтувати вибір раціональних умов, параметрів та технології культивування дріжджів для виробництва ліпідів з наступним отриманням біодизеля;

3. розрахувати технічні показники обраного типу ферментера для культивування дріжджів та матеріальний баланс процесу;

4. розробити технологічну і апаратурну схеми культивування дріжджів з подальшим одержанням біодизельного палива; розробити креслення обраного типу виробничого ферментера;

5. охарактеризувати пропозиції та заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

1.1 Характеристика та переваги дріжджових грибів в якості продуцента ліпідів для виробництва біодизеля

1.1.1 Характеристика та перспективи використання дріжджових грибів у енергетиці

Біодизель став найбільш стійкою та поновлюваною альтернативою дизелю, отриманому з викопних корисних копалин. Він визначається як суміш алкільних ефірів жирних кислот, зазвичай отриманих з рослинних олій та тваринних жирів [3]. Біодизель є поновлюваним, нетоксичним, здатним до біорозкладання, стійким, екологічно чистим і не містить сірки та ароматичних сполук. Він має більше цетанове число та більшу температуру спалаху, ніж звичайний дизель. Його змащувальні властивості підвищують ефективність двигуна, тому не потрібно використовувати додаткові мастила для двигунів. Показник емісії вуглекислого газу для біодизеля майже на 78% менший порівняно зі звичайним дизельним паливом [4]. Ці властивості біодизеля роблять його ідеальним паливом для забруднених міст та відіграють важливу роль при нинішніх глобальних змінах клімату, оскільки він є кліматично нейтральним.

Біодизель зазвичай виробляється в процесі хімічної переестерифікації олій, що отримують з олійних культур, наприклад як ріпак, соя, соняшник та пальма. Використання рослинних олій у якості сировини становить приблизно 88% виробничих витрат, збільшуючи вартість біодизеля у порівнянні з викопним аналогом, що є основною перешкодою для його масштабного виробництва та широкого застосування [5]. Крім того, існує дискусія щодо

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Демченко К.					11	81
Конс..						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Реценз.								
Керівн.		Зубченко Л.С.						
Затверд.								

доцільності використання полів для вирощування олійних культур та видобутку харчових олій для виробництва біопалива, в той час як у світі існує глобальна проблема голоду. Тому багато досліджень зосереджені на використанні дешевих та нежирних сировинних ресурсів, таких як відходи або нежирні масла [1]. У зв'язку з цим мікробні олії стали альтернативною сировиною для виробництва біопалива третього покоління. Мікробні олії – це олії, що виробляються ліпідоутворюючими мікроорганізмами (МО), тобто мікроорганізмами, здатними накопичувати більше 20% сухої маси клітини (СМК) у формі ліпідів у вигляді крапель [3]. Це накопичення відбувається в основному за рахунок надлишку джерела вуглецю та обмеження кількості інших складових поживного середовища, таких як, наприклад, джерела азоту [6].

До груп МО, які є перспективними в якості джерела ліпідів для виробництва біодизеля, належать дріжджі, бактерії, цвілеві гриби та мікроводорості [7]. Основною перевагою технологій виробництва біодизеля за участі МО у порівнянні з класичною технологією є те, що МО можна вирощувати в рідкому середовищі в контрольованих умовах і легко обробляти. Середній вихід біодизеля з пальми становить близько 5950 дм³/га, в той час як мікроводорості можуть продукувати до 136 900 дм³/га, тобто врожайність мікроводоростей у 23 рази більша, ніж пальми [8].

Проте мікроводорості мають значний недолік в тому, що їх використання обмежене через малу кількість засобів генетичної трансформації для ядерних або хлоропластних геномів [9]. Моделей видів мікроводоростей на вистачає, оскільки процес модифікації даних еукаріотичної клітин є складним. Тому в даний час досліджуються інші МО, здатні накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди у кількостях більше 20% від СМК. Дослідження демонструють, що дріжджі є більш ефективними, ніж бактерії та мікроводорості в плані накопичення ліпідів та різних параметрів процесу (табл. 1.1) [10].

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.1 – Порівняльна характеристика ліпідуютьорюючих мікроорганізмів [9]

Характеристика	Мікроорганізм		
	Мікроводорості	Дріжджі	Бактерії
Піддаються впливу клімату	+	–	–
Споживають різні джерела вуглецю	–	+	–
Виробництво ендотоксинів	–	–	+
Толерантність до інгібування побічними продуктами	Низька	Висока	Низька

Серед дріжджів представники родів *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces* і *Trichosporon* вважаються олеогенними. За певних умов культивування дріжджі здатні накопичувати до 50–76% ліпідів із СМК [11]. Найбільш перспективними видами з точки зору продукування ліпідів є *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* та *Cutaneotrichosporon oleaginosus*.

Переважа маслянистих культур дріжджів – незалежність від погодних умов, більш значимих у випадку з рослинами, а також відсутність синтезу ендотоксинів, що є значним недоліком при роботі з бактеріями. Залежно від виду дріжджів для досягнення фази стабільного накопичення ліпідів (стаціонарна фаза) потрібно майже 5–9 днів. Крім того, маслянисті дріжджі мають унікальну здатність синтезувати ліпіди, споживаючи велику кількість поновлюваних субстратів, таких як органічні залишки сільського господарства та промисловості, що може зменшити виробничі витрати [12].

Ліпіди з дріжджів – це переважно триацилгліцериди (ТАГ), які за своїм хімічним складом можна порівняти з ліпідами, які одержують з рослинних

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

олій. У більшості видів дріжджів переважають пальмітинова C_{16:0}, олеїнова C_{18:1} та ліноленова C_{18:2} жирні кислоти (табл. 1.2). З їх допомогою можна отримати ТАГ, близький за змістом до рослинних олій. Наприклад, вміст ліпідів *Lipomyces starkeyi* за складом нагадує пальмову олію, а ліпіди, що виробляються видами роду *Lipomyces*, нагадують олію какао [11].

Таблиця 1.2 – Кількісний та якісний склад ліпідів основних жирних кислот у певних видів дріжджів [4]

Вид	Жирна кислота, %					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18	52	2	20	-	-
<i>Candida albicans</i>	12	8	7	36	25	10
<i>Lipomyces starkeyi</i>	33	4,8	4,7	55,1	1,6	-
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	18	3	3	66	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	15	-	2	57	24	1

Економічна оцінка є життєво важливою у виробництві. Найбільш комерційно важливою проблемою є те, що виробництво мікробних біодизелів або біоліпідів із цукровмісної сировини є менш ефективними у порівнянні з біоетанолом. Мікробні біодизелі, що виробляються аеробно, мають більший потік вуглеводів, спрямований на виробництво ферментів та біомаси, а не на саме біопаливо. Більше того, енергія зі спожитого цукру частково витрачається під час відділення біодизеля. Однак виробництво біодизелів або біоліпідів може стати економічно вигідним за використання дешевих субстратів. Деякі види дріжджів є пристосованими до використання гідрофобних субстратів (наприклад, жировмісні побутові та промислові відходи), які можуть бути використані з меншими фінансовими витратами. Ще одна стратегія більш економічно вигідного виробництва біодизеля – це спроможність спільного споживання різних джерел вуглецю, наявних у субстраті.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

За оцінками дослідників [13], вартість фінансування виробництва, розрахованого на виготовлення 10 000 т мікробної олії на рік, становитиме 34 доларів США на рік, що є досить високою ціною. Проте даний розрахунок проводився за умови використання глюкози в якості джерела вуглецю, із витратами 400 доларів/т. Якщо джерело вуглецю буде заміщене альтернативним субстратом, то вартість виробництва такого біодизеля стане значно нижчою[13].

Можна зробити висновок, що окремі види дріжджів є перспективним продуцентом для використання у цілях біоенергетики. За певних умов рівень накопичення ліпідів у клітинах дріжджів становить понад 50%, вони не залежать від кліматичних умов на відміну від рослинної сировини, піддаються біоінженерним модифікаціям та не виробляють ендотоксинів, тобто є більш безпечним продуцентом у порівнянні з бактеріями. Також однією з найбільш привабливих рис дріжджів є здатність використання у якості субстрату не лише глюкози, а й альтернативних джерел вуглецю, що робить виробництво більш економічно вигідним.

1.1.2. Обґрунтування вибору виду дріжджових грибів для отримання біодизельного пального

Нетрадиційні дріжджі *Yarrowia lipolytica* розглядаються як модельні дріжджі для отримання ліпідів з перспективними потенціалами для подальшого використання у біоенергетиці [14].

Y. lipolytica – один з найбільш вивчених нетрадиційних видів дріжджів. Його виділяють з молочних продуктів, таких як сири Камамбер і Рокполь [15], сухі ферментовані ковбаси [16] та інші середовища з високим вмістом жирів або вуглеводів, наприклад, прогірклий маргарин, а також забруднений нафтою ґрунт та морська вода [17]. *Y. lipolytica* належить до порядку аскоміцетів. Це непатогенні облігатні аеробні дріжджі, здатні до споживання широкого спектру джерел вуглецю, таких як різні типи олій, жирів та вуглеводнів. *Y.*

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

lipolytica має широкий спектр біотехнологічних застосувань за рахунок унікальних фізіологічних характеристик та добре розвинених генетичних інструментів для модифікації їх метаболізму [18].

Морфологія колоній штамів *Y.lipolytica* залежить від генетичного походження, складу середовища та умов росту, такими як джерела вуглецю та азоту, аерація, рН тощо. Морфології колоній можуть варіюватися від гладких і блискучих до сильно перекручених і матових [18]. Клітинні стінки *Y.lipolytica* містять галактоманнани. За формою дріжджові клітини сфероїдальні, еліпсоїдальні або видовжені.

Y. lipolytica – це диморфні дріжджі, можуть утворювати справжні гіфи залежно від середовища та фази росту. Справжній міцелій складається з септованих гіфів шириною 3–5 мкм і довжиною до декількох мм. Апікальні клітини часто перевищують 100 мкм по довжині, тоді як сегменти мають довжину 50–70 мкм. Утворення гіф сильно стимулюється глюкозою, цитратом, оливковою олією, олеїноювою кислотою та інші жирними кислотами, як джерелами вуглецю, а також застосування таких джерела азоту, такі як амоній, казеїн, соя або екстракт м'яса. Навпаки, утворення гіф гальмує дефіцит сульфату магнію та хлориду заліза або наявність цистеїну або зниженого [18].

Штам *Y. lipolytica* використовує як статеве, так і безстатеве розмноження. Отже, у них життєвий цикл з гаплоїдними та диплоїдними фазами. У *Y.lipolytica* відбувається безстатеве розмноження за допомогою багатостороннього брунькування та періодичного утворення артроконідій.

Y. lipolytica відомі своєю значною ліполітичною та протеолітичною активністю. Ці характеристики роблять їх клітинною фабрикою для виробництва багатьох позаклітинних ферментів, таких як протеаза, естераза та, зокрема, ліпази, що може значною мірою сприяти виробництву біопалива. *Y. lipolytica* стає загальноприйнятим продуцентом для виробництва біодизеля. Переваги даного виду у виробництві біодизеля обумовлені двома притаманними йому характеристиками:

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- виробництво ліпаз різних типів, які можна використовувати як біокатализатори для біоконверсії рослинних або мікробних олій у біодизельне паливо;
- даний вид накопичує велику кількість ліпідів, які можуть бути використані в якості вихідних матеріалів для отримання біодизеля.

Важливо зазначити, що інші дріжджі, такі як *Rhodosporidium toruloides*, *C. antarctica*, *C. rugosa*, *Cryptococcus sp.* та інші також розглядаються як біокатализатори для виробництва біодизеля, проте найбільш перспективними продуцентами виявилися штами *Y. lipolytica* [19]. Цей нетрадиційний модельний дріжджовий організм здатний синтезувати також ряд ліпідних сполук, таких як жирні спирти, алкани, та кетони. Ліпіди можуть вироблятися *Y. lipolytica* з промислово корисними показниками, в деяких випадках перевищуючи 1,2 г/дм³/годину [20]. Ліпіди можна легко перетворити в метилові або етилові ефіри жирних кислот шляхом хімічної переестерифікації. Результати випробувань біодизеля, отриманого з різних джерел, вже показали, що біодизель, виготовлений з застосуванням *Y. lipolytica*, добре працює у діючих дизельних двигунах [21].

Y. lipolytica може накопичувати ліпіди до майже 40% від СМК [16]. Хоча це і доволі високий показник, але він може бути підвищений до комерційного рівня. Метаболічна інженерія *Y. lipolytica* представляється достатньо перспективною для збільшення цього показника, оскільки цей вид має повністю секвенований геном та добре анотовану метаболічну мережу разом із зростаючим набором інструментів генетичних маніпуляцій [22, 23]. З метою створення *Y. lipolytica* як платформи для виробництва біопалива, однією з найважливіших стратегій метаболічної інженерії дріжджів є перенаправлення потоку метаболізму на синтез жирних кислот та ТАГ. Дослідження демонструють, що шляхом перенаправлення метаболічних шляхів можна досягти вмісту ліпідів понад 62% від СМК [24].

Більше того, метаболічна інженерія з використанням метаболічного мережевого аналізу може використовуватися не тільки як стратегія для

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

підвищеного виходу ліпідів і вдосконалення кінцевого продукту, але також дає уявлення про основи ліпогенезу, оскільки механізм надлишкового вироблення ліпідів у дріжджах ще недостатньо зрозумілий.

R. toruloides має деякі можливості генної інженерії, тоді як методи генетичної інженерії для *L. starkeyi* та *C. oleaginosa* в даний час недостатньо розвинені [25]. Тобто, у сенсі наявності засобів генної інженерії очевидно, що *Y. lipolytica* є найбільш розвиненим з потенційних продуцентів на даний час.

Отже зважаючи на низку переваг перед іншими продуцентами ліпідів, таких як: висока продуктивність накопичення ліпідів, можливість виробництва ліпаз різних видів та використання широкого спектру субстратів, *Y. lipolytica* було обрано як продуцент ліпідів для виробництва біодизеля.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.2. Обґрунтування вибору технології культивування дріжджів *Y.lipolytica* з метою отримання ліпідів для виробництва біодизеля

1.2.1. Характеристика технології культивування дріжджів *Y.lipolytica* з метою отримання ліпідів та подальшим виробництвом біодизеля

Існує велика кількість потенційних технологічних шляхів для перетворення біомаси дріжджів у паливо. Вони можуть бути розділені на наступні такі основні категорії:

- 1) використання трансформації екстрактів дріжджів (наприклад, ліпідів, вуглеводів) в біопаливо;
- 2) використання дріжджів для виробництва молекул палива (наприклад, етанол, водень, метан, алкани) в результаті їх життєдіяльності.

На рис.1.1. зображено блок-схему отримання біодизеля з дріжджів, згідно якої технологічні процеси можна поділити на:

- культивування;
- дезінтеграція клітинних стінок;
- зневоднення клітин;
- екстракція;
- відгонка екстрагенту та виділення клітинних залишків;
- фракціонування ліпідів;
- трансетерифікація ліпідів;
- очистка ліпідів;
- змішення метилових ефірів;
- отримання готового продукту.

Найважливішим є етап культивування дріжджів, оскільки від підбору оптимальних умов культивування та обладнання залежить вихід та склад ліпідів, які на наступних стадіях будуть перетворені на готовий продукт – біодизель.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рисунок 1.1 – Блок-схема виробництва біодизеля з дріжджових ліпідів

1.2.2. Характеристика поживного середовища для культивування дріжджів *Y.lipolytica*

Більшість дріжджів в якості джерела вуглецю надають перевагу глюкозі і не переходять на споживання інших цукрів до тих пір, поки глюкоза з субстрату не буде спожита. Одночасне використання глюкози та інших джерел цукру мікроорганізмами досліджене мало [16]. Однак це є важливим фактором для виробництва біопалива з різних субстратів, таких як суміш цукрів, отриманих з їстівних лігноцелюлозних біомас, а також вуглеводневих відходів виробництва.

Yarrowia lipolytica може засвоювати різні цукри, такі як глюкоза, фруктоза, манноза та галактоза, хоча може бути деяка різниця у швидкості росту та споживання кожного із цукрів [26]. Глюкоза є одним з найпопулярніших джерел вуглецю, що застосовуються для культивування. Глюкоза зазвичай утворюється при гідролізі крохмалю амілазою, на який багаті кукурудза, картопля та багато інших продуктів сільського господарства.

Однією з цікавих властивостей цього виду дріжджів є ріст на незвичних джерелах вуглецю, таких як гідрофобні субстрати: н-алкани, 1-алкени, жирні кислоти, жири, олії та парафіни. Дріжджі також можуть засвоювати асимільовані поліметильовані та хлоровані алкани. *Y.lipolytica* дуже ефективно деградує гідрофобні субстрати за специфічними метаболічними шляхами. Загальна вартість сировини може бути значно знижена, якщо замість чистої глюкози штам-продуцент буде безпосередньо метаболізувати інші види субстратів. З цією метою проводять виведення нових штамів *Y.lipolytica*, здатних до експресії ферментів, які каталізують перетворення інших субстратів на глюкозу та в подальшому використовувати її для синтезу ліпідів. Порівняльна характеристика виходу ліпідів при використанні різних джерел вуглецю відображена у табл.1.3.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.3 – Порівняльна характеристика метаболічної активності та виходу ліпідів при використанні різних субстратів для штамів дріжджів *Y.lipolytica* [25]

Штам	Субстрат	Концентрація субстрату, г/дм ³	Титр ліпідів, г/дм ³	Вихід ліпідів, %
MTYL037	Ацетат	50	2	25,5
ATCC 8662	Кукурудзяна олія	20	5,4	60
MUCL 28849	Промисловий гліцерол	80	16,11	38,15
A101	Фруктоза	100	2,19	13
W29	Галактоза та глюкоза (1:1)	20	1,92	17,2
ACADC 50109	Промислові жирові відходи	15	6,8	54
W29	Олеїнова кислота	20	2,44	50
Polg	Гідролізат цукрової тростини	20	6,68	58,5

Крім цукрів, *Y.lipolytica* може використовувати етанол або ацетат в якості субстрату. *Y.lipolytica* має ендogenous функціональні гени, що кодують альдегіддегідрогенази, необхідні для засвоєння та ферментації етанолу [11]. Хоча високий вміст етанолу є токсичним для клітин, найвища межа толерантності для *Y. lipolytica* в етанолі становить до 3%. Крім того, оскільки глюкоза пригнічує багато функціональних ферментних шляхів у *Y.lipolytica*, етанол може бути кращим для утворення певних продуктів за допомогою методів модифікації метаболічного шляху. Проте даних про вплив етанолу на синтез ліпідів поки що мало.

Ацетат також може бути використаний як субстрат для процесів культивування *Y.lipolytica*. Ацетат значно пригнічує ріст клітин, коли його

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

концентрація вище 10 г/дм³, однак концентрація 4 г/дм³ або менше добре переноситься клітинами [11]. Хоча у культуральному середовищі може використовуватися лише ацетатна сіль, а не оцтова кислота для підтримки рівня рН, придатного для росту клітин, додатковий ацетат викликає підвищення рН, коли він поступово витрачається під час культивування, що призводить до гальмування росту клітин, коли значення рН перевищує межу допуску. Тому ацетат не рекомендується в якості основної або єдиної сировини. Натомість він, як правило, сумісний з іншим субстратом, наприклад з соняшниковою олією [27] або пропіоновою кислотою та ЛЖК [18].

Як можна побачити з табл.1.3, найбільший вихід ліпідів спостерігається при використанні у якості сировини гліцерину. Гліцерин є основним побічним продуктом виробництва біодизельного пального на основі рослинної олії. Він може бути використаний як економічний субстрат для промислового культивування. *Y. lipolytica* може рости на гліцерині зі швидкістю, яку можна порівняти зі швидкістю росту на глюкозі, і здатна виробляти з неї ліпіди та органічні кислоти [26]. Оскільки глюкоза загалом пригнічує поглинання інших джерел вуглецю, гліцерин може стати кращим джерелом вуглецю для культивування.

Робота [28] демонструє, що гліцерин значно швидше та ефективніше засвоювався *Y.lipolytica* порівняно з глюкозою. Накопичення ліпідів досягає максимуму на відносно ранньому етапі фази росту у всіх колбах і залишається постійним. Виробництво лимонної кислоти збільшується на пізніх стадіях культивування, що збіглося з виснаженням ліпідів. З іншого боку, загальна концентрація біомаси незначно зростала на пізніх стадіях культивування, що передбачає синтез клітинних сполук, відмінних від ліпідів (тобто полісахаридів або пептидів [28]). Склад жирних кислот за умови використання у якості джерела вуглецю гліцерину замість глюкози змінюється не значно.

Основними ЖК, що утворюються незалежно від тривалості культивування та субстрату, є олеїнова кислота, пальмітинова кислота, лінолева кислота та стеаринової кислота. Вміст ліпідів клітин *Y.lipolytica* (у %

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

від СМК) значно збільшився з гліцерином як джерелом вуглецю і досяг 40% порівняно з 23% з глюкозою. Використання гліцерину клітинами як прямого попередника ТАГ може пояснити такі результати.

Отже, у якості найбільш перспективного джерела вуглецю, що сприяє підвищенню накопиченню ліпідів у клітинах дріжджів *Y.lipolytica* у процесі культивування обрано промисловий гліцерин (чистота 80%) – відходи біодизельного виробництва.

Хоча відомі різні лімітуючі фактори, які стимулюють накопичення ліпідів в маслянистих дріжджах, обмеження вмісту азоту в поживному середовищі широко використовується для створення умов, придатних для їх синтезу [12]. Обмеження вмісту азоту здійснюють на більш ранній стадії під час вирощування (10–15 год), при цьому спостерігається зниження питомої швидкості виділення CO₂. Оптимальний склад поживного середовища для вирощування дріжджів *Y.lipolytica* з метою отримання ліпідів на основі промислового гліцерину відображений у табл.1.4.

Таблиця 1.4 – Склад поживного середовища для культивування *Y.lipolytica* [13]

Компонент поживного середовища	Вміст, г/дм ³
KH ₂ PO ₄	7
Na ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5
CaCl ₂	0,15
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,06
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
Дріжджовий екстракт	0,5
Гліцерол (чистота 80%)	50

1.2.3. Вплив режиму та умов культивування на ріст дріжджів *Y. lipolytica* та вихід цільового продукту

Режим культивування. Виробництво тригліцеридів у *Yarrowia lipolytica* є глобальною реакцією на нестачу азоту та наявність надлишкового джерела вуглецю [29]. Відомі на сьогодні технологічні схеми культивування *Y. lipolytica*, з метою отримання ліпідів є двостадійними: перша стадія включає накопичення клітинної біомаси та розвиток клітин, друга – вироблення тригліцеридів, внаслідок обмеження вмісту азоту в середовищі [26]. Більшість промислових процесів культивування – це періодичні або періодичні з підживленням ферментаційні операції. Вони мають ряд переваг: простота роботи, мінімізований ризик контамінації, високий титр продукту, гнучкість вибору кінцевого продукту та великий досвід застосування у промисловості [26]. Проте, незважаючи на широку популярність технологій періодичного та напівперіодичного культивування в середині минулого століття, вони, як правило, мають значно менші об'ємні показники виробництва.

Безперервне культивування привернуло більше уваги як засіб для поліпшення продуктивності по об'єму. Продуктивність у більшості відомих процесів безперервного бродіння краща, ніж у періодичних процесів, але, як правило, цей спосіб культивування призводить до зменшення виходу або концентрації продукту у середовищі, або і того, і іншого [29]. Низькі вихід та концентрація продукту, а також необхідність підсилених заходів по запобіганню контамінації призвели до того, що у великомасштабному виробництві безперервний спосіб культивування дріжджів використовують досить рідко.

Безперервне культивування може бути одностадійним або багатостадійним, залежно від кінетики отримання цільової молекули. Одностадійне безперервне бродіння підходить для процесів біовиробництва, пов'язаних з ростом, тобто у тих випадках, коли продукт є біомасою або небіомасовим продуктом зі швидкістю виробництва, пропорційною швидкості

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

росту. Однак більшість продуктів синтезу, включаючи вторинні метаболіти, в тому числі і ТАГ, лише частково пов'язані з ростом або не пов'язані взагалі. Для безперервних процесів синтезу кінетика, яких не пов'язана з ростом, зазвичай використовують кілька ферментерів для розділення процесу на окремі операції (ріст клітин та синтез ліпідів), щоб умови для росту клітин та утворення продукту можна було оптимізувати окремо.

У роботі [29] було розроблено двоступеневий безперервний процес культивування для отримання ТАГ рекомбінантними штамами *Y.lipolytica* та порівняно його зі стандартними періодичними процесами. Розроблений режим призвів до поліпшення продуктивності без втрат титру та виходу ТГА. Один цикл культивування триває 120 годин. Перші 72 години відбувається нарощування клітинної біомаси з інокуляту у ферментері 1 за умови постійного надходження джерела вуглецю. На другій стадії відбувається перекачування культуральної рідини у ферментер 2, здійснюється підвищення рН шляхом додавання КОН. Через 48 год культивування у другому ферментері здійснюється відкачування продукту з другого ферментера у резервуар для зберігання. Температура, рН та pO_2 контролюються впродовж усього процесу.

Двоетапна безперервна ферментація успішно поліпшила продуктивність ТГА на 80% та концентрацію на 40% порівняно зі стандартними результатами періодичного та напівперіодичного культивування.

Кислотність середовища. Ріст багатьох видів дріжджів обмежується певним оптимальним значенням рН, зі зниженням швидкості росту, коли рН не є оптимальним. У цьому відношенні *Y.lipolytica* дуже відрізняється здатністю адаптуватися до широкого діапазону умов рН (2,5 – 7,2), зміщуючи структуру метаболіту, не погіршуючи ріст або швидкість поглинання субстрату [30].

Дослідження [30] порівнює продуктивність 20 ізолятів дикого типу дріжджів *Y.lipolytica*, вирощених на середовищі з гліцерину з обмеженням по джерелах азоту у біореакторах при двох різних умовах рН (3,5 та 5,5). Для усіх штамів визначали потенціал до синтезу лимонної кислоти, ізолимонної

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кислоти, манітолу, арабітолу та еритритолу в контрольованому середовищі біореактора. Автори роблять висновок, що низькі значення рН ($pH = 3,5$) зміщують метаболізм *Y. lipolytica* у сторону синтезу поліолів (переважно еритрол і меншою мірою манітол). В той час як дещо вищі значення рН ($pH = 5,5$) стимулюють синтез лимонної та ізілімонної кислот. З метою одержання бажаного продукту, що може використовуватися у виробництві біодизеля, – ліпідів – у роботі [29] пропонується підвищення рН до 6,0 під час другої стадії культивування, що змістить метаболізм від синтезу лимонної кислоти та поліолів до синтезу ліпідів. Концентрація рН підтримується на цьому рівні шляхом автоматичного додавання КОН.

Вміст кисню у середовищі. *Y. lipolytica* – це облигатно аеробні дріжджі, в результаті чого кількість доступного кисню є важливим параметром. Споживання кисню залежить від різних фаз росту та опосередковується кінцевими оксидазами. Система окиснювального фосфорилування відіграє значну роль у енергетичному метаболізмі клітин цих дріжджів. Клітини дріжджів адаптуються до окисних умов завдяки збільшенню активності таких ферментів, як клітинна каталаза, супероксиддисмутаза, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа та глутатіонредуктаза [31].

Добре зафіксовано, що для різних штамів дріжджів, включаючи *Y. lipolytica*, обмеження азоту в середовищі поступово змінюють метаболізм від фази росту клітин до вироблення лимонної кислоти та/або накопичення ліпідів [28]. Внутрішньоклітинний цитрат, як відомо, є основним джерелом вуглецю для синтезу жирних кислот, а також може регулювати метаболізм глюкози через його алостеричне пригнічення фосфофруктокінази. Цитрат є ключовим проміжним продуктом як в катаболізмі, так і в анаболізмі ліпідів, і він займає важливе місце в метаболізмі дріжджів, а отже, на його виробництво впливають умови вирощування та джерело енергії та карбону.

На ріст та виробництво ліпідів та лимонної кислоти впливає доступність кисню. У роботі [30] проводились дослідження виходу продукту у культурах з та без контролю концентрації розчиненого кисню (pO_2). Автори

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

повідомляють, що підтримання рівня pO_2 при 50% насиченні повітря посилює синтез лимонної кислоти в присутності глюкози, тоді як значного впливу pO_2 на виробництво лимонної кислоти та ліпідів культурою, що використовувала у якості джерела вуглецю гліцерин, не спостерігалось. Більше того, використання лимонної кислоти для синтезу ліпідів, незважаючи на наявність надлишку глюкози в середовищі, спостерігалось після обмеження вмісту гліцерину в культурах, для яких pO_2 не регулювали.

Автори роблять висновок, що обмеження доступу кисню, зміщує метаболізм, пригнічуючи цикл Кребса та, відповідно, виробництво цитратів, та збільшуючи утворення ліпідів. Дисбаланс, який проявляється в метаболізмі внаслідок обмеження вмісту гліцерину, призводив до регуляції шляху гліюксилату та повторного використання цитрату, незважаючи на наявність надлишку глюкози. Тобто у випадку використання у якості джерела карбону гліцерину, для зміщення метаболізму у сторону синтезу ліпідів, бажано обмежувати доступ кисню.

Температура. Рекомендована температура росту для *Y.lipolytica* становить 25-30°C і рідко перевищує 34°C [32]. Однак стабільний ріст та утворення продуктів при більш високих температурах потенційно можуть бути вигідними, особливо для масштабних процесів, оскільки зменшення охолодження скорочує енерговитрати. Крім того, теплові градієнти, які можуть з'явитися в таких процесах, можуть негативно вплинути на продукти ферментації, якщо штам є високочутливим. Проте варто враховувати, що при більш низьких температурах (10-12°C) ступінь ненасиченості жирів, які синтезують *Y. lipolytica* незначно зростає [33].

У роботі [32] було проаналізовано залежність виходу ліпідів від температури культивування (було досліджено температури 28°C та 35°C). Результати виявилися суперечливими: в залежності від обраного штаму продуктивність ліпідів могла як підвищуватися, так і знижуватися з підвищенням температури. Склад жирних кислот лише дещо змінювався в залежності від штаму, середовища і температури. Найбільш домінуючими

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

жирними кислотами в усіх зразках були олеїнова та стеаринова кислоти. Чітких тенденцій щодо співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот не спостерігалось між температурами культивування. Оптимальна температура для вироблення ліпідів більшістю штамів становить 28°C, а інкубація при 33°C [32], тому саме цей температурний режим обрано для технології.

З огляду на простіше апаратне оформлення обрано періодичний одноступінчастий процес культивування з підживленням гліцерином та тривалістю одного виробничого циклу 5 діб у виробничому ферментері з підтриманням рівня рН=6,0±0,3, рівня кисню 25% та температури 30±2°C.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

1.3. Методи виділення ліпідів з дріжджів *Y.lipolytica*

Один з найбільш тривалих та енергозатратних кроків у виробництві мікробного біодизеля – є відновлення біомаси з ферментера та процес виділення олії з дріжджів [34]. Виробництво біодизеля з олеогенних дріжджів має ряд обмежень щодо способів вилучення ліпідів, які є основною перепорою для переносу даної технології на масштаб масового виробництва. Крім того, одним із недоліків усього процесу є необхідність працювати при помірних температурах, щоб уникнути хімічних модифікацій жирних кислот, окислення та прогіркання олії. Таким чином, пошук альтернативи діючим методам руйнування мікроорганізмів для видобутку олії має першорядне значення для покращення якості виробництва та зниження виробничих витрат.

Як правило, виділення ліпідів з дріжджових клітин здійснюється в 5 етапів [34]:

- 1) макроскопічна попередня обробка;
- 2) сепарація мікро- та макромолекул;
- 3) вилучення;
- 4) виділення та очищення;
- 5) утворення продукту.

Огляд літератури показує, що інформації про вилучення ліпідів з *Y.lipolytica* є вкрай мало [34]. Низка методів вилучення ліпідів з маслянистих дріжджів в даний час аналізується в лабораторіях (екстракція, ультразвуковий та мікрохвильовий методи, кислотний каталіз з гарячою водою, H_2O_2 з $FeSO_4$, осмотичний шок, гомогенізація високого тиску (ГВТ) тощо), однак мало з цих методів вилучення були доведені придатними для промислового масштабу виробництва [35]. Вилучення ліпідів за допомогою різних фізичних або механічних методів має ряд переваг та недоліків (рис 1.2).

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

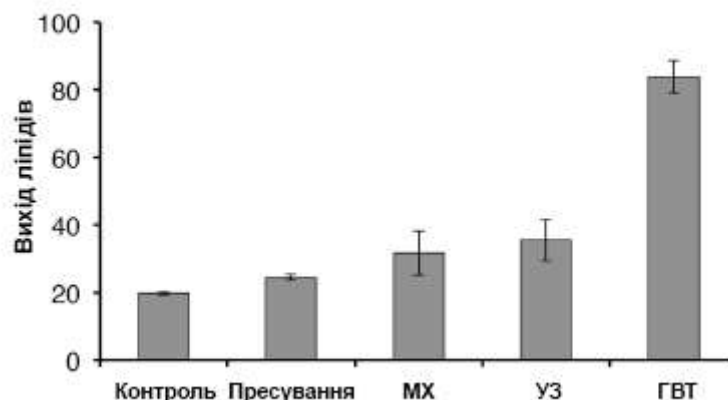


Рисунок. 1.2 – Вихід ліпідів при використанні різних методів руйнування клітин дріжджів *Y. lipolytica*. МХ – мікрохвильове опромінення, УЗ – обробка ультразвуком, ГВТ – гомогенізація високого тиску [36].

Пресування – це найпростіший механічний метод, який широко використовується для вилучення ліпідів з біомаси водоростей та олійних культур, також є дослідження використання цього методу для культур дріжджів [36]. Техніка цього процесу полягає у створенні високого механічного тиску, що застосовується до клітин, що призводить до видавлювання олій з біомаси. Високий тиск генерує багато тепла та призводить до інших проблем. Хоча цей метод сам по собі не є дороговартісним, рівень вилучення ліпідів є порівняно низьким. Крім того, цей метод придатний лише для зразків з низьким вмістом вологи, тобто як і для методу екстракції потребується висушування біомаси, що знову вимагає великих додаткових витрат енергії та коштів [37]. Дослідження [36] демонструє, що найнижчі результати вилучення були отримані з використанням пресування у порівнянні з контролем (екстракція н-гексаном без будь-якої попередньої обробки). Це свідчить про те, що метод пресування є малоефективним, оскільки тиск не був достатнім для руйнування клітин.

Обробка ультразвуком (УЗ) – це альтернативна методика вилучення ліпідів з олеогенних мікроорганізмів, що долає проблеми, пов'язані з традиційними методами. Цей спосіб є технологічно простим у виконанні,

екологічно-безпечним, вимагає менших витрат часу та може експлуатуватися у помірному стані температури та тиску, а також не потребує високотоксичних хімікатів.

Застосування УЗ з підтримкою температури на рівні 20°C призводить до збільшення виходу екстракції з $19,8 \pm 0,5\%$ (без попередньої обробки) до $35,5 \pm 6,1\%$ [36]. УЗ позитивно впливає на руйнування клітинних стінок, що призводить до збільшення виходу олії. Цей факт пов'язаний в основному з акустичною кавітацією та утворенням газових мікро бульбашок у мікробній суспензії [38]. Газові бульбашки ростуть до досягнення нестабільних розмірів, а потім раптово руйнуються. Тим самим виділяється інтенсивна енергія з важливими хімічними (тобто вільними радикалами) та механічними ефектами (тобто мікроструями), що призводять до руйнування частинок і клітин [38].

Однак, незважаючи на значне збільшення виходу олії порівняно з необробленим зразком (контролем), УЗ як метод руйнування клітин залишається недостатньо ефективним для вивільнення всього вмісту олії.

Мікрохвильове опромінення (МХ) також використовується для вилучення ліпідів з насіння і вперше було застосоване в 1980-х роках. Мікрохвильовий метод зазвичай застосовується для діелектричних або полярних частинок, де тертя внаслідок між- та внутрішньомолекулярного руху виробляє велику кількість тепла. Молекули води, присутні у внутрішньоклітинному просторі, утворюють пару, яка чинить тиск на клітинну стінку і призводить до пошкодження мембран клітин. У мембрані утворюється велика кількість пор, що відіграє велику роль у процесі вилучення олії. Однак в мікрохвильовому опроміненні використовується велика кількість електроенергії, що в подальшому призводить до високих витрат переважно в комерційних масштабах, і в цілому це впливає на якість продукції [39].

Цей метод може бути дуже ефективними для селективного вилучення іонів, цукрів, барвників та білків з електропорованих клітин [39]. Однак ефективність цього метода вилучення ліпідів з *Y.lipolytica* не була

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

продемонстрована [36]. Крім того, мікрохвильове опромінення негативно впливає на кінцевий якісний та кількісний склад жирних кислот. Це можна пояснити утворенням вільних радикалів та інших реакційноздатних видів груп у середовищі при застосуванні даного методу [36], що тим самим може посилити деградацію та погіршення якості олії (табл 1.5).

Тому існує потреба у вивченні та випробуванні інших методів руйнування клітин, таких як *гомогенізація високого тиску* (ГВТ). Ця методика зазвичай використовується для процесів емульгування [40], однак вона є найбільш поширеним методом для руйнування мікробних клітин у великомасштабних біопроцесах, і була продемонстрована її ефективність для вилучення олії з біомаси водоростей [37]. Механізм руйнування клітин за допомогою ГВТ полягає у прокачуванні клітинної суспензії через вузький отвір (розмір мкм), де потік прискорюється, і зазнає численних явищ, таких як напруга зсуву, кавітація, турбулентність і тертя [37], сприяючи фрагментації клітин. Даний метод є найбільш ефективним з точки зору повноти виходу олії з клітин [36]. Це призводить до отримання $83,9 \pm 4,8\%$ виходу видобутку ліпідів порівняно з контролем, що був лише $19,8 \pm 0,5\%$. Хоча деякі зміни в складі жирних кислот були помічені, ГВТ може бути обраний як найбільш ефективний метод руйнування клітин, що дозволяє отримати найвищий вихід олії (табл.1.5).

Таблиця 1.5 – Порівняльна характеристика складу жирних кислот (%) при використанні різних технологій руйнування клітин [36]

Жирна кислота	Контроль	Пресування	МХ	УЗ	ГВТ
C _{16:0}	21,34	21,88	22,57	21,36	19,95
C _{16:1}	0,57	0,71	0,69	0,58	0,55
C _{18:0}	6,54	7,39	6,54	6,41	6,66
C _{18:1}	15,66	12,02	14,07	16,85	21,24
C _{18:2}	19,05	16,94	20,53	18,35	19,83
C _{18:3}	0,29	0,38	0,34	0,35	0,17

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

Екстракція ліпідів традиційними методами (метод Бліга та Дайєра, метод Фолча) потребує великих кількостей токсичних органічних розчинників (хлороформ та метанол). Крім того у промислових масштабах екстракцію ліпідів проводять із сухої біомаси; тому процес вимагає великих затрат енергії в процесі зневоднення та сушіння клітин [34]. У процесі екстракції розчинників клітини повинні контактувати з фазою органічного розчинника для вилучення ліпідів, тоді як у вологому стані клітини не можуть змішуватися з розчинниками та залишатися у водяній фазі через наявність поверхневих зарядів. Тому важливо вилучати ліпіди з мокрої біомаси, щоб забезпечити можливість проходження процесу.

У роботі [34] описується екстракція ліпідів *Y. lipolytica* з вологої біомаси у поєднанні з методом ГВТ. Олію екстрагували додаванням н-гексану з подальшою гомогенізацією з використанням диспергатора, що забезпечило високий вихід продукту ($79.9 \pm 11.5\%$). Довга тривалість екстракції (120 хв) може суттєво вплинути на споживання енергії, тому час вилучення було скорочено до інтервалів 5 хв. Це означає, що розчинник оновлювався кожні 5 хв замість 15 хв, що зменшує затрати енергії та підвищує якість екстракції.

Цей вихід є нижчим у порівнянні з ліофілізацією (сухий спосіб), але його можна покращити, змінивши інші параметри процесу, такі як тип розчинника, співвідношення рідка-тверда речовина та ін. нижче. Але на відміну від сухого способу, добування ліпідів з вологої біомаси є більш екологічно-безпечним процесом. Ця концепція ґрунтується на відкритті та проектуванні технічних процесів, що знижують споживання енергії та води, переробку побічних продуктів та дозволяють отримати якісний та безпечний продукт.

Таким чином, з урахуванням усіх переваг та недоліків вищезазначених методів, у якості основного шляху руйнування клітин дріжджів з метою екстракції ліпідів з біомаси дріжджів було обрано гомогенізацію високого тиску через його простоту у технічному оснащенні, екологічну безпечність, відсутність необхідності у високотоксичних реагентах та додаткових затратах

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

енергії, що робить його більш прийнятним у порівнянні з мікрохвильовим опроміненням, а також він характеризується порівняно високим виходом ліпідів на відміну від традиційного методу пресування та обробкою ультразвуком. У якості екстрагента обрано н-гексан. Для отримання продукту високої якості було обрано метод екстракції з попередньо висушеної сировини. Для сушіння використовується ліофільна сушка.

1.4. Вибір каталізатора для реакції трансестерифікації

Перетворення жирних кислот у метилестери жирних кислот може проводитися трьома різними методами: мікроемульсіями (сумісне розчинення), термічним крекінгом (піроліз) та трансестерифікацією (алкоголіз). Серед цих методів трансестерифікація є найбільш підходящим методом, оскільки дозволяє досягнути ще і зниження в'язкості, пов'язаної з особливостями мікробних ліпідів [41].

Реакція трансестерифікації має різні переваги перед іншими методами, такі як екологічна безпечність та можливість використання для різних сировинних матеріалів. Цю реакцію можна класифікувати на два типи в залежності від наявності або відсутності каталізатора. Процес каталізованої трансестерифікації зазвичай досягається хімічним або ферментативним каталізом [18]. Однорідна каталітична переестерифікація є реакцією, яку найбільш широко використовують для отримання біодизеля (рис.1.3). В залежності від хімічної природи каталізатора, вона може бути кислою або основною. Вибір каталізатора залежить від складу жирних кислот. Кількість каталізатора, його молярне співвідношення до ліпідів, тривалість реакції та температура безпосередньо впливають на кінцевий вихід біодизеля [17].

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						35
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рисунок 1.3 – Реакція каталізованої трансестерифікації [19]

Хімічна трансестерифікація є клопітким процесом, який споживає енергію, і внаслідок якого утворюються небезпечні побічні продукти, такі як мила та пігменти, які посилюють поділ молекул біодизеля [42]. Більше того, такі процеси, як відновлення гліцерину, видалення неорганічних солей та води з продукту, видалення каталізатора та очищення лужних стічних вод є складними та потребують додаткових витрат [19].

Нещодавно були запропоновані ферментативні методи виробництва біодизеля, які можуть подолати недоліки звичайних хімічно каталізованих процесів (табл 1.6).

Таблиця 1.6 – Порівняльна характеристика різних способів трансестерифікації [19]

Показник	Хімічний метод		Ферментативний метод
	Кислотний каталізатор	Лужний каталізатор	
Вихід біодизеля	>90%	>96%	>96%
Перетворення ВЖК субстрату	Утворення біодизеля	Формування мил	Утворення біодизеля
Вода у субстраті	Впливає на хід реакції	Впливає на хід реакції	Не впливає на хід реакції

Відновлення гліцеролу	Складний процес, гліцерол низької якості	Складний процес, гліцерол низької якості	Гліцерол високої якості, складна очистка не потрібна
Швидкість реакції	Низька	Висока	Низька
Температура реакції	>100°C	60-80°C	20-50°C
Відновлення каталізатора	Складне	Складне	Просте
Можливість повторного використання	-	-	+
Ціна каталізатора	Низька	Низька	Висока
Утворення стічних вод	Високий рівень	Високий рівень	Низький рівень

Процес, що каталізується ферментами, має ряд переваг [42]: можливість використання олії низької якості; менша складність через менш строгі умови процесу; легше відділення кінцевих продуктів; зниження енергоспоживання; можливість повторного використання каталізатора та більша екологічна безпека.

Ліпази є широко розповсюдженими у природі ферментами і виробляються тваринами (підшлункова залоза великої рогатої худоби, овець, свиней), рослинами (папайя, ріпак, овес та насіння рицини) та мікроорганізмами (бактеріями, грибами та дріжджами). Мікробні ліпази здобули особливу увагу в промисловості через свою активність у широкому діапазоні рН, термостійкість стабільність, широку субстратну специфічність, високий вихід, легкість генетичних маніпуляцій, регулярне виробництво через

відсутність залежності від клімату [19]. *Y. lipolytica* продукує як зовнішньо-, так і внутрішньоклітинні ліпази. На інтенсивність виробництва ліпази у *Y. lipolytica* впливають різні фактори середовища: наявність джерела вуглецю та азоту, температура, доступність кисню тощо [43].

Ліпази здатні каталізувати декілька реакцій, що становлять промисловий інтерес при синтезі біодизеля: гідроліз, естерифікація та трансестерифікація. Трансестерифікація використовується для отримання біодизеля на основі ліпази. При реакції гідролізу ліпідів ліпазою активний сайт ферменту утворює ковалентний проміжний ефір з донором ацилу і молекула води надходить для гідролізу ефіру з утворенням вільних жирних кислот як кінцевих продуктів.

Через високу ефективність процесу та вже досліджену технологію для виробництва біодизеля з ліпідів *Y. lipolytica* було обрано хімічний метод переестерифікації з метанолом з використанням лужного каталізатора КОН.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ПРОЦЕСУ ВИРОНИЦТВА

ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ *Y.lipolytica*

2.1. Метаболізм ліпідів у дріжджів *Y.lipolytica*

Олеогенні дріжджі, як правило, продукують полярні ліпіди (тобто вільні жирні кислоти (ВЖК), гліколіпіди та фосфоліпіди) та нейтральні ліпіди (тобто ТГА та естери) [18]. Синтез та накопичення ВЖК можливий двома шляхами: *de novo* та *ex novo*.

За допомогою гідрофобних клітинних поверхонь клітини *Y.lipolytica* можуть приєднуватися до великих ліпідних крапель у поживному середовищі та виділяти як ПАР, так і емульгатори, що полегшує перший етап використання гідрофобного субстрату. ТАГ субстрату розщеплюються на жирні кислоти та гліцерин за участі позаклітинних ліпаз [26], щоб їх можна було використовувати у метаболізмі клітини. Ключові гени, які беруть участь у метаболізмі жирних кислот, були визначені та переглянуті [44]. Ці гени в основному відносяться до тих, що кодують внутрішньоклітинні ліпази та тих, що беруть участь в активації, транспортуванні та деградації жирних кислот або проміжних сполук в метаболізмі жирної кислоти в пероксисомі [44]. Відзначається, що метаболічний шлях жирних кислот та надмірна експресія ключових генів, що беруть участь у поглинанні та деградації ліпідів, забезпечують ефективний ріст клітин на масляних субстратах та подальші біоперетворення жиромісних відходів у потрібні продукти [26].

Для вирощування ліпідів, ліпідних продуктів, органічних кислот та / або інших супутніх продуктів було вивчено два поширених гідрофобних субстрати, рослинні олії та алкани. Для використання жирних кислот механізм транспортування ще недостатньо вивчений. Вважається, що селективне поглинання жирних кислот відбувається у *Y.lipolytica*, вирощеному на жирних

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Демченко К.			БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ПРОЦЕСУ ВИРОНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖАМИ <i>Y.lipolytica</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..							39	81
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Зубченко Л.С.						
Затверд.								

кислотах з різною кількістю подвійних зв'язків і довжиною ланцюга [44].

Ненасичені олеїнові ($C_{18:1}$) та лінолеві кислоти ($C_{18:2}$) легше споживаються, ніж насичені пальмітинова ($C_{16:0}$) та стеаринова ($C_{18:0}$) кислоти при рості клітин на промислових жирах [26]. Метаболізм жирної кислоти, в якому беруть участь дві специфічні до жирних кислот ацил-КоА синтетази (ACS I та II), також залежить від довжини вуглецевого ланцюга. У пероксисомі ACS II перетворює коротколанцюгові жирні кислоти в ацил-КоА відповідної жирної кислоти. У цитозолі ACS I перетворює довголанцюгові жирні кислоти у ацил-КоА, які можуть бути використані як субстрати для синтезу ліпідів або подальшого транспортування в пероксисому для β -окиснення. Внутрішньоклітинні жирні кислоти можуть розкладатися як шляхом β -окиснення, так і ω -окиснення (рис. 2.1).

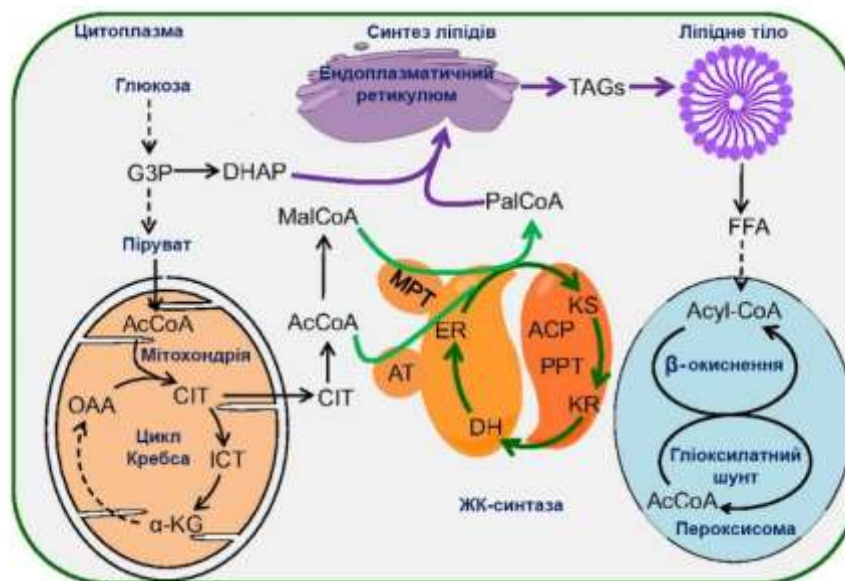


Рисунок 2.1 – Спеціалізовані ліпогенні метаболічні шляхи фізично розділені в різних клітинних компартментах [45]: AcCoA – ацетил-КоА; α -KG – α -кетоглутарат; AT – ацилтрансфераза; CIT – цитрат; DH – гідроксиацил-ACP-дегідратаза; DHAP – дигідроксіацетонфосфат; ER – еноіл-ACP редуктаза; FFA – вільні жирні кислоти; G3P – гліцеральдегід 3-фосфат; IKT – ізоцитрат; KR – кетоацил-ACP редуктаза; KS – кетоацил-ACP-синтаза; MalCoA – малоніл-КоА; OAA – оксалоацетат; PPT – фосфопантетеїніл-трансфераза.

β -окиснення відбувається в пероксисомі. У кожному циклі β -окиснення з основи жирної кислоти втрачається два атоми вуглецю і утворюється один ацетил-КоА. У *Y. lipolytica* β -окиснення починається ацил-СоА оксидазами. Наступні два етапи β -окиснення каталізуються багатофункціональним ферментом (БФФ). β -окиснення закінчується на останній стадії тіолазою P_{OT1}. Оскільки β -окиснення відбувається в пероксисомі, основною стратегією блокування шляху β -окиснення є видалення ключових генів PEX, щоб зробити біогенез пероксисом нефункціональним. Хоча жирні кислоти в основному розкладаються через β -окиснення в пероксисомі, вони також можуть проходити шляхом ω -окиснення, що виникає в ендоплазматичному ретикулумі [26]. Під час ω -окиснення вуглець, найбільш віддалений від карбонової групи жирної кислоти, спочатку окиснюється ω -гідроксилазою жирної кислоти, що міститься в цитохромі P450, до відповідної ω -гідрокси жирної кислоти.

Потім ω -гідрокси жирна кислота перетворюється на жирний альдегід, дана реакція каталізується жирною спиртовою дегідрогеназою. Нарешті, жирний альдегід перетворюється на дикарбонову кислоту жирною альдегіддегідрогеназою.

Накопичені ліпіди можуть використовуватися як структурні компоненти клітини, виділятися у позаклітинний простір, або для виробництва енергії. Важливо також зазначити, що накопичення ліпідів у *Y. lipolytica* не є залежним від фази росту, хоча велика їх кількість виробляється на ранній фазі росту і досягає найвищого рівня при вступі в стаціонарну фазу.

2.1. Характеристика готового продукту дріжджів *Y. lipolytica*

Хімічно біодизель визначається як моноалкільні складні ефіри довголанцюгових жирних кислот, отриманих з поновлюваних біоліпідів. Біодизель зазвичай отримують шляхом реакції олій біологічного походження

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						41
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

з метанолом або етанолом у присутності каталізатора, отримуючи метилові або етилові естери і гліцерин [46].

Загалом, біодизель може бути визначений як побутове, відновлювальне паливо для дизельних двигунів, отриманих з природних масел, що відповідає специфікаціям ASTM D 6751 [46]. Біодизель застосовується як добавка для традиційного виду палива (дизеля) і має ряд перспективних характеристик, включаючи зменшення емісії парникових газів.

Біодизелі характеризуються своєю в'язкістю, густиною, цетановим числом, температурами плавлення та кипіння, діапазоном дистиляції, точкою спалаху, зольністю, вмістом сірки, залишком вуглецем, кислотним числом, корозією міді та більш високою здатністю до нагрівання (табл.2.1). Найважливішими змінними, що впливають на вихід естеру під час реакції переестерифікації, є молярне відношення спирту до олії та температура проходження реакції. Значення в'язкості метилових естерів рослинної олії різко знижуються після переестерифікації.

Таблиця 2.1 – Технічна характеристика біодизеля, виготовленого з використанням штаму *Yarrowia lipolytica* [46].

Назва	Біодизель
Хімічний склад	Метилові естери C ₁₆ -C ₂₀ жирних кислот
Мінімальний вміст естерів у готовому продукті, %	96,5
Вміст сірки, %	0,006 – 0,020
Вміст азоту, %	0,002 – 0,007
Вміст ароматичних сполук, %	0
Зольність, %	0,002 – 0,036
Йодне число	102
Кінетична в'язкість (за 40°C), м ² /с	4,1 · 10 ⁻⁶
Густина (за 15°C), кг/м ³	884

Продовження Таблиці 2.1

Цетанове число	52
Температура кипіння, °C	202
Температура спалаху, °C	>100
Розчинність у воді	Не розчинний
Візуальна характеристика	Чиста рідина жовтуватого кольору
Запах	Слабкий мильний запах
Реактивність	Стабільний, проте бажано уникати окиснюючих агентів

Відповідно до технологічної схеми біодизель отримують з дріжджових ліпідів методом переестерифікації з метанолом з використанням лужного каталізатора. Отриманий біодизель відповідає стандартам ДСТУ 6081:2009 «Паливо моторне. Ефіри метилові жирних кислот олій і жирів для дизельних двигунів. Технічні вимоги» (затверджено Наказом Держспоживстандарту від 20.01.2009 р. № 27), а також європейському стандарту EN 14214:2003.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1. Сировина і матеріали

При виробництві ліпідів дріжджових грибів з використовується основна сировина та утворюються напівпродукти (табл.3.1). До основної сировини відноситься гліцерин, до допоміжної – компоненти поживного середовища, реагенти, повітря та інші матеріали, необхідні для проведення процесу культивування та подальшої очистки.

До напівпродуктів, які утворюються в результаті даної технології, відносять відпрацьване поживне середовище та біомаса дріжджів.

Таблиця 3.1. – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД для перевірки сировини	Показники, що нормуються	Примітка
1. Основна сировина			
1.1. Гліцерин промисловий	ГОСТ 6259-75	Масова частка гліцерину (не менше 80%)	Джерело вуглецю для культивування дріжджових грибів
1.2. Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості	Кольоровість, каламутність, запах, рівень рН, жорсткість, вміст мікроорганізмів і бактерій, згідно за ГОСТ	Приготування поживного середовища, дезінфікуючих розчинів та реагентів

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Демченко К.				ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА			Літ.	Арк.	Аркушів	
Конс..									44	81	
Реценз.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ							
Керівн.	Зубченко Л.С.										
Затверд.											

Продовження Таблиці 3.1

1.3. Вода артезіанська	ДСанПіН2.2.4-171-10	Органолептичні, мікробіологічні, рівень рН, жорсткість	Використання у технічному процесі після очищення
2. Допоміжна сировина			
2.1. Хлорне вапно	ГОСТ 1692-85	Усі показники у відповідності до постачання даної сировини	Дезінфекція обладнання
2.2. Метанол	ДСТУ 3057-95 (ГОСТ 2222-95) Метанол технічний. Технічні умови	Відповідність категорії сировини призначенню	Приготування розчину метоксиду для проведення естерифікації
2.3. Гідроксид натрію	ГОСТ 4328-77	Відповідність категорії сировини призначенню	Приготування розчину метоксиду для проведення естерифікації
2.4. Гідроксид калію	ГОСТ 24363-80	Відповідність категорії сировини призначенню	Підтримка рН поживного середовища під час культивування
2.5. Кислота нітратна	ГОСТ 4461-77	Відповідність категорії сировини призначенню	Приготування розчину для промивання біодизеля
3. Напівфабрикати			
3.1. Біомаса дріжджів	Згідно технологічного регламенту	Усі показники у відповідності до технологічного процесу	Після екстракції ліпідів
3.2. Поживне середовище	Згідно технологічного регламенту	Усі показники у відповідності до технологічного процесу	Після фільтрування на фільтр-пресі

3.2. Опис технологічного процесу виробництва дріжджових ліпідів з подальшим отриманням біодизеля

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка приміщення. Огляд устаткування персоналом до проведення технологічного процесу та експлуатації, відповідно до вимог регламенту. Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готує блок стерилізації, що призначений за наказом відповідальної особи цеху/підрозділу/ділянки.

ДР 1.2. Підготовка обладнання. Через технологічне обладнання пропускають мийні засоби. Вузли обладнання вимиваються в розчині мийного засобу при температурі 70-80°C. Обробку ферментера проводять розчином каустичної соди після кожного культивування, за температури 20°C. Потім його заповнюють водою до необхідного рівня. Розчин каустичної соди перемішують барботажним повітрям упродовж 15 хв. Відпрацьована вода йде до ЗВ14. Перевірка на герметичність обладнання та трубопроводів проводиться перед кожним запуском виробничої лінії повітрям або водою під надлишковим тиском.

ДР 1.3. Стерилізація обладнання. Стерилізацію проводять шляхом подання гострої пари при температурі 131°C, тиску 0,2 МПа, протягом 30 хв. Після стерилізації утворений конденсат подається до ЗВ14.

ДР 2. Підготовка води

Якість води в системах водопостачання може відрізнятися за вмістом неорганічних, органічних речовин, жорсткістю, солоністю, складом та концентрацією мікроорганізмів тощо, в залежності від місця знаходження виробництва. Тому, раціональним є використання артезіанської води, яка проходить попереднє очищення та знесолення.

Для очищення води пропонується установка зворотного осмосу ВодИнТех-М (Росія) з продуктивністю 40 м³/год, потужністю до 45 кВт. Очищена вода подається на ДР5, ДР6.1, ДР6.2.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 3. Підготовка повітря для барботування

ДР 3.1. Забір повітря з атмосфери. Процес забору повітря проводять за допомогою повітрозабірника Пз-21, що знаходиться за межами повітродувної станції, з точкою забору 4-6 м вище рівня землі при температурах від -20 °С до 45°С.

ДР 3.2. Компресування та кондиціонування повітря. Для компресування повітря застосовують компресор К-22. Тиск нагнітання становить 0,163 МПа. На даній стадії кожен годину здійснюється технологічний контроль тиску за допомогою технічного манометру. після компресорів повітря надходить у холодильник Х-23. Перед фільтрами встановлюють ресивер Р-24, який служить для вирівнювання тиску в системі й забезпечення рівномірної подачі повітря на фільтри.

ДР 3.3. Попереднє очищення повітря. Повітря пропускають крізь волокнисту касету типу G4 (груба очистка) з фільтром Ф-25, що затримує пил і частинки. Фільтрувальним матеріалом є тканина з діаметром пор 1 мкм. Ефективність очищення - 98% (ДСТУ 3186-95).

ДР 3.4. Очистка на індивідуальних фільтрах. Ретельне очищення повітря відбувається за допомогою фільтра, ефективність якого 99,97% (Ф-26). Фільтр дозволяє проводити очищення від часток діаметром до 0,3 мікрон.

ДР 4. Приготування розчину метоксиду

Розчин метоксиду використовується для реакції трансестерифікації. Для підвищення виходу естерів метанол необхідно брати у надлишку (на 5% більше від стехіометричного розрахунку), каталізатор – 10% від маси метанолу.

Метанол подається через рідинний насос – дозатор Д-27 у змішувач З-29, який обладнано турбінною мішалкою. До метанолу з дозатора Д-28 додається NaOH. Змішування речовин відбувається протягом 15 хв. до досягнення гомогенного розчину. Розчин метоксиду відправляється на ТП12.1 в Д-55.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 5. Приготування розчину для промивання біодизеля

Біодизельна фракція містить залишки лугу, метанолу, гліцеролу, мила та води, які впливають на якість біодизельного палива. Для її очищення від домішок використовують розчин 10% нітратної кислоти. Розчин готують шляхом розведення концентрованої кислоти. У змішувачі З-32, оснащеним турбінною мішалкою, до води зі стадії ДР2 вносять визначену кількість нітратної кислоти через об'ємний дозатор Д-30 при інтенсивному перемішуванні протягом 20 хв. Розчин для промивки біодизеля відправляється на ТП12.3 в Д-58.

ДР 6. Приготування поживного середовища

При вирощуванні дріжджів у ферментер необхідно вносити поживні речовини у кількості, що забезпечує необхідний приріст біомаси та максимальне накопичення ліпідів у клітинах.

ДР 6.1. Підготовка розчину КОН. Для підтримки рівня рН у середовищі на стадії виробничого культивування ТП8 необхідне приготування розчину КОН, що відбувається у змішувачі З-35. КОН поступає через дозатор Д-33, Вода поступає з ДР2 через об'ємний дозатор Д-34.

ДР 6.2. Змішування компонентів поживного середовища. Проводиться у змішувачі Зм-38 перемішування здійснюється за допомогою турбінних мішалок. Потужність мішалки – 1 кВт, частота обертів – 680 об/хв. Змішувачі обладнані шнековими дозаторами Д-36 та Д-37 для подачі компонентів середовища.

В якості основного джерела вуглецю обрано промисловий гліцерол (чистота 80%). Склад поживного середовища:

K_2HPO_4 – 7 г/дм³; Na_2HPO_4 – 2,5 г/дм³; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5 г/дм³; CaCl_2 – 0,15 г/дм³; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,15 г/дм³; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02 г/дм³; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г/дм³; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 г/дм³; Гліцерол – 50 г/дм³.

ДР 6.3. Стерилізація поживного середовища. Процес стерилізації стандартного середовища необхідний для запобігання контамінації середовища сторонніми мікроорганізмами. Процес стерилізації проводять

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

гарячою парою під тиском протягом 25 хвилин, тиск – 0,2 МПа, при температурі – 130°C в автоклаві А-39, куди подаються поживне середовище після змішувача Зм-38.

ДР 7. Підготовка посівного матеріалу

Колби з музейною культурою *Yarrowia lipolytica*, що зберігалися при температурі -80°C, розморожують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Інокулят готується у інокуляторі І-41 шляхом перенесення розчину флакона, до якого подається поживне середовище з ДР6.3 через шнековий дозатор Д-40. Для культивування обрано інокулятор для вирощування посівного матеріалу з трьохлопатевою мішалкою та кільцевим барботером. Культура вирощується протягом 18-24 год при 30°C, 300 об/хв, рН = 5,5. Зі стадії ДР3.4 у інокулятор подається очищене повітря. Посівний матеріал подається в Фв-43 на виробничк культивування.

ТП 8. Виробниче культивування

Підготовлене та простерилізоване поживне середовище з автоклаву А-39 надходить до виробничого ферментера Фв-43 і змішується з інокулятом для подальшого культивування. Перемішування здійснюється за рахунок механічного перемішування з використанням мішалки та барботажного повітря, що подається з барботера. Тривалість одного циклу культивування складає 120 год.

Значення рН контролюється за допомогою датчика рН на рівні 5,5 протягом 0-24 год, а потім збільшується до 6,0 і підтримували на цьому за рахунок подачі розчину КОН (10%) від ДР6.1. Підживлення гліцерином розпочинається, коли його концентрація в середовищі знижується нижче 50 г/дм³. Концентрація гліцерину підтримується на рівні близько 50 г/дм³ протягом усього процесу, регулюючи швидкість подачі гліцерину на підставі показань датчика.

Барботажене повітря подається з ДР 3.4. через інжектор з нижнього боку реактора. Швидкість подачі барботажного повітря становить 60 дм³/год. Рівень розчиненого у середовищі кисню (рО₂) встановлюється на рівні 25%

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

насичення. Температура підтримується на рівні 30°C протягом усього циклу. Температурний режим підтримується за рахунок надходження у сорочку ферментера теплового агенту у вигляді підігрітої води. Даний показник регулюється за допомогою датчика температури.

ТП 9. Відділення біомаси дріжджів від культуральної рідини

ТП 9.1. Гомогенізація культуральної рідини

За допомогою насосу суспензія дріжджів подається у збірник Зб-44, а потім подається у гомогенізатор. Гомогенізація дріжджів проводиться за допомогою гомогенізатора високого тиску Г-47. Температуру суспензії під час процесу підтримували на рівні 25°C, а тиск регулюється на рівні 15 МПа. Гомогенізація сприяє руйнуванню клітинних стінок та пришвидшує вихід ліпідів. Осад проходить далі на фільтрування на фільтр-пресі Фп-49.

ТП 9.2. Фільтрування на фільтр-пресі

Біомаса подається у фільтр-прес Фп-49 насосною системою Н-48 та проходить вздовж довжини пластин, доки усі камери не заповняться суспензією. Під тиском тверді частинки осаджуються на поверхні фільтрувальної тканини, густина осаду поступово збільшується. Відпрацьоване середовище направляється на ЗВ14. Проводиться технічний контроль обладнання та забрудненість фільтрувального матеріалу.

ТП 10. Ліофільне висушування вологої біомаси.

ТП 10.1 Заморожування. Перший етап ліофільного висушування в ліофільній сушарці ЛС-50 проходить за температури -40°C, атмосферному тиску протягом 3 годин. Відбувається глибинне заморожування води, що знаходиться у міцелію. Проводиться технічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 10.2 Первинне висушування. Другий етап ліофільного висушування протікає за температури -5°C та тиску 0,01 МПа протягом 12 годин. При наднизькому тиску кристалізована вода, що містилася у клітинах дріжджів з твердого стану одразу переходить у газоподібний. Водяна пара відводиться з

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

апарату, конденсується та відправляється на стадію ЗВ 14. Проводиться технологічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 10.3 Вторинне висушування. Третій етап ліофільного висушування протікає за температури 30°C у вакуумі (залишковий тиск $P = 133$ Па) протягом 8 годин. На цій стадії випаровується залишкова волога і відводиться у вигляді водяної пари. Проводиться технологічний контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 11. Екстракція ліпідів з біомаси.

ТП 11.1 Екстракція ліпідів н-гексаном. Ліпіди з ліофілізованої біомаси дріжджів видобувають екстракцією н-гексаном у екстракторі Е-52. Співвідношення екстрагент:тверда речовина становить 10:1.

ТП 11.2 Розділення екстракту шляхом охолодження. Отриманий внаслідок екстракції розчин подається у сепаратор Сп-53, де, під дією води для охолодження в сорочці апарату, охолоджується до температури 5°C. Екстракт розділяється на суміш ліпідів і н-гексан, та використовується повторно. Ліпідна суміш надходить у змішувача З-55 за використанням насосної системи Н-54 для проведення реакції переестерифікації. Проводиться контроль обладнання та основних параметрів процесу.

ТП 12. Приготування біодизеля

Приготування біодизеля здійснюється за технологією з використанням метанолу та гідроксиду натрію (розчину метоксиду), який підготовлений на стадії ДР5.

ТП 12.1. Естерифікація. Олія надходить до змішувача З-56 за допомогою вмонтованого насоса, де відбувається нагрівання до 60°C шляхом подачі теплоносія до сорочки та перемішування олії з розчином метоксиду, який надходить з ДР4. Реакція проводиться протягом 2 год.

ТП 12.2. Відстоювання та фракційне розділення. Після проведення естерифікації суміш поступає у збірник Зб-57. Відстоювання проводять протягом 30 хв., після чого гліцеролову фракцію (побічний корисний продукт) зливають і відправляють на доочистку від метанольної фракції з метою

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

використання у якості джерела вуглецю на стадії приготування поживного середовища.

ТП 12.3. Промивання біодизеля водою та відстоювання. Біодизель відділений від гліцеролу поступає у другий змішувач 3-59, оснащений душем для подачі підкисленої води для промивання біодизеля. Після відстоювання протягом 30-40 хв. відпрацьовану воду відправляють на знешкодження ЗВ14.

ТП 12.4. Осушення біодизеля у збірнику. Біодизель зливають у збірник 3б-60, де відбувається відстоювання протягом 2 діб. За цей період залишки води, яку не вдалося видалити під час попередньої технологічної операції відстоювання, опускаються на дно ємності, звідки видаляються на ЗВ14. Осушений біодизель, готовий до реалізації, відвантажують споживачам.

ПВ 13. Переробка відходів

На дану стадію поступають:

1. Відпрацьовані фільтрувальні елементи, можуть піддаватися промиванню та регенерації. Після закінчення терміну експлуатації або в разі непридатності до повторного використання відпрацьовані фільтрувальні елементи транспортуються на полігони для нейтралізації або утилізації.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

На дану стадію поступають:

Відпрацьована вода після миття обладнання та конденсат, що утворюється при ліофільному сушінні біомаси скидаються в міську каналізаційну мережу.

Біомаса дріжджів від ТП11.1, відпрацьоване поживне середовище (після 10-20 разів вторинного використання) з ТП9. Біомасу дріжджів та відпрацьоване поживне середовище піддають термічному знезараженню та реалізують в якості добрив, або сировини для виробництва біометану.

ПВ15 Регенерація теплоносіїв

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відпрацьовані теплоносії з ТП7, ТП8, ДР9.1, ТП12.1, конденсат від ДР1.3, ДР5 та відпрацьований холодоагент від ТП11.2 подаються на регенерацію де за рахунок рекуперації тепла в теплообміннику відновлюються їх необхідні робочі температури.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3. Матеріальний баланс

Таблиця 3.2. – Матеріальний баланс процесу виробництва біодизеля з ліпідів дріжджів.

Стадія	Використано		Отримано	
	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість, кг	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість, кг
Стадія отримання поживного середовища	Вода	904,25	Поживне середовище для вирощування дріжджів	980
	KH ₂ PO ₄	8,75		
	Na ₂ HPO ₄	3,1		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,84		
	CaCl ₂	0,18		
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,18		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02		
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,07		
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,61		
	Гліцерол (чистота 80%)	61		
Стадія підготовки посівного	Поживне середовище	80	Інокулят	100
	Нарощена в матрацах біомаса музейної культури	20		
Стадія виробничого культивування	Поживне середовище	900	Культуральна рідина	995
	Інокулят	100	Втрати (0,5%)	5

Продовження Таблиці 3.2

Стадія виділення ліпідів з біомаси дріжджів	Суха біомаса	400	Суміш ліпідів	204
			Біомаса дріжджів	196
Стадія переестерифікації	Суміш ліпідів	204	Ефір	210
	Метанол	33	Вода	22,65
	Каталізатор (NaOH)	3	Гліцерин	15,73
	Кислота (HNO ₃) 10%	8,38		
ВСЬОГО	2648,38		2648,38	

3.4. Контроль виробництва

Таблиця 3.3 Контроль виробництва

Стадія процесу, місце заміру параметра або відбору проби	Параметр, що контролюється, одиниці вимірювання, вид контролю	Частота контролю	Норми технологічного режиму та допустимі	Метод контролю параметра, тип приладу
ДР1.3. Стерилізація обладнання	Температурний режим	Під час стерилізації	$T = 131^{\circ}\text{C}$,	Термометричний,
	Час стерилізації		$t = 30 \text{ хв}$	годинник
	Тиск		$P = 0,2 \text{ МПа}$	манометр
ДР3.2 Компресування та кондиціонування повітря	Температурний режим	Під час проведення кондиціонування	$t = 20\text{-}25^{\circ}\text{C}$	Термометричний
ДР3.3. Попечення очистка повітря	Чистота повітря	Після очистки повітря на головному фільтрі	$E = 98\%$	Перевірка ступеню очищення

ДР3.4. Очистка повітря на індивідуальних фільтрах	Чистота повітря	Після очистки повітря на головному фільтрі	$E = 99,97\%$	Перевірка ступеню очищення
ДР 4. Приготування розчину метоксиду	Концентрація NaOH	Під час приготування розчину	$C(\text{NaOH}) = 1,5\%$	Об'ємний
ДР5. Приготування розчину для промивання біодизеля	Концентрація HNO_3 у розчині для промивання	Після приготування розчину	$C(\text{HNO}_3) = 10\%$	Хімічний метод, перевірка концентрації
ДР6.1. Приготування розчину КОН	Концентрація КОН	Після приготування розчину	$C(\text{KOH}) = 10\%$	Хімічний метод, перевірка концентрації
ДР6.2. Змішування компонентів поживного середовища	Маса компонентів поживного середовища	При завантаженні до апарату	За технічним регламентом підприємства	Масове дозування
ДР6.3. Стерилізація поживного середовища	Температурний режим	Під час стерилізації	$T = 130^\circ\text{C}$	Термометричний,
	Час стерилізації		$t = 25 \text{ хв}$	годинник

	Тиск		$P = 0,2$ МПа	манометр
ТП7. Підготовка посівного матеріалу	Температура	Автоматично під час підготовки посівного матеріалу	$T = 30^{\circ}\text{C}$	Термометричний
	pH		pH = 5,5	pH-метр
	час		t= 18 год	годинник
ТП8. Виробниче культивування	Температура	Автоматично під час виробничого культивування	$T = 30^{\circ}\text{C}$	Термометричний
	pH		pH = 5,5	pH-метр
	час		t= 18 год	Годинник
	Концентрація гліцеролу		$C_{\text{гл}} = 50$ г/л	Концентратомір
ТП9. Гомогенізація культуральної рідини	Тиск у гомогенізаторі	Під час проведення гомогенізації	$P = 15$ МПа	Манометр в апараті
ТП10. Люфільне висушування біомаси	Температура	Автоматично	$T = -5^{\circ}\text{C}$	Термометричний
	тиск		$P = 0,01$ МПа	Манометр в апараті
	час		t= 12 год	Годинник

Продовження Таблиці 3.3

ТП11.1. Екстракція ліпідів n-гексаном	Час проведення екстракції	Під час проведення екстракції	t = 1 год	Годинник
ТП11.2. Розділення екстракту шляхом заморожування	Температура у сепараторі	Під час розділення	T = 5°C	Термометричний
ТП12.1. Естерифікація	Температура	Під час проведення естерифікації раз на 30 хв	T = 60°C	Термометричний
ТП12.4. Осушення біодизеля у збірнику	Якість отриманого біодизеля	1 раз на добу		ДСТУ 6081:2009

РОЗДІЛ 4 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖОВИХ ГРИБІВ

4.1. Обґрунтування вибору виробничого ферментера

З урахуванням обраної технології культивування до виробничого ферментера висуваються наступні вимоги:

- Простота конструкції апарату і його економічна ефективність.
- Ефективна аерація та перемішування культуральної рідини з метою забезпечення рівномірного протікання процесу росту і розмноження.
- Підтримка оптимального тиску та температури.
- Забезпечення високої інтенсивності масо- і енергообміну клітин із середовищем.

Найпоширенішою конструкцією ферментера у сучасній біотехнології є апарати з механічним перемішуванням. Механічний пристрій, який міститься в таких конструкціях, складається з центрального вала й мішалок з лопатями різноманітної форми. На апаратах механічного перемішування розміщують відбиваючі перегородки, які представляють собою вузькі металеві пластини, що приварені до внутрішніх стінок реактора, на однаковій відстані одна від одної. Економічність, висока швидкість масопередачі кисню та поживних речовин, необхідних для розвитку продуцентів – переваги, які сприяють розповсюдженню та збільшенню потреби у застосуванні даного виду апаратів у промисловості [47].

Для ферментерів з механічними перемішувальними пристроями характерна наявність елемента, що здійснює первинне диспергування газу. Дані функції виконує барботер. Барботер – пристрій, у нижній частині якого розташований елемент для подачі газу або пари, як правило, виконаний у вигляді трубок з отворами. Принцип роботи барботера полягає у підведенні

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Демченко К.			РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІПІДІВ ДРІЖДЖОВИХ ГРИБІВ	Літ.	Арк.
Конс..							60
Реценз.							81
Керівн.		Зубченко Л.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ	
Затверд.							

під шар рідини дрібних бульбашок газу, які спричиняють підйом вгору часток рідини і таким чином створюють інтенсивне перемішування.

На основі характеристик та вимог до апарату, було обрано ферментер з механічним перемішуючим пристроєм барботажного типу. (Рис.4.1).

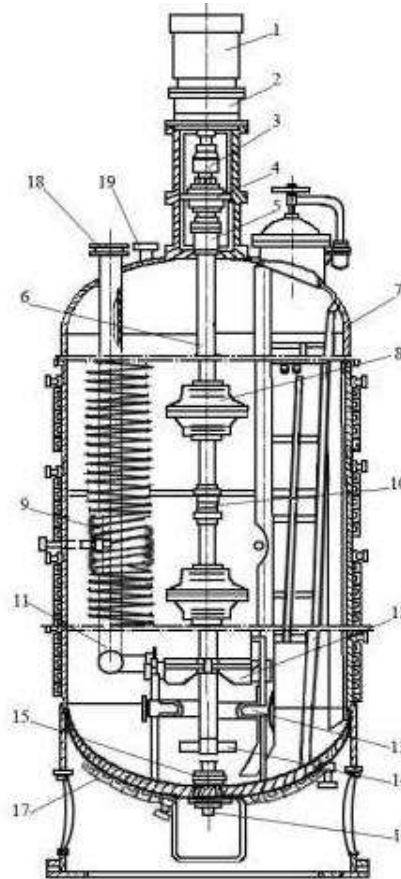


Рисунок 4.1 Ферментер барботажного типу з механічним перемішуючим пристроєм [47].

1 – електродвигун, 2 – редуктор, 3 – муфта, 4 – підшипник, 5 – торцеве ущільнення, 6 – вал, 7 – корпус, 8 – турбінна мішалка, 9 – змійовик, 10 – муфта, 11 – труба для підводу повітря, 12 – лопатева мішалка, 13 – барботер, 14 – гвинтова мішалка, 15 – опірний підшипник, 16 – штуцер для спуску, 17 – оболонка, 18 – лаз-люк, 19 – патрубок завантаження.

Даний ферментер рекомендовано використовувати для стерильних процесів вирощування продуцентів біологічно активних речовин, що відповідає обраній технології. Співвідношення висоти та діаметра – 1,8:1. На кришці апарату розташований привід перемішуючого приладу, що

складається із електродвигуна 1, редуктора 2, муфти 3, підшипника 4 та торцеве ущільнення 5. Тут же встановлено штуцери для завантаження поживного середовища та посівного матеріалу 18, подачі та виходу повітря 19, оглядові вікна, люки для загрузки миючої механічної головки; запобіжний клапан.

Для вивантаження культури в днище апарата передбачений спускний штуцер 16. Всередині корпуса 7 проходить вал 6 із закріпленим на ньому перемішуючим приладом, що складається із закритих турбін 8. Барботер 13 з'єднаний з трубою 11 для підводу повітря і виконаний у вигляді ромба із перфорованих труб. Зверху розташовані в шахматному порядку 2000-3000 отворів. Вал 6 і перемішуючі пристрої 8, 12, 14 з муфтами 10 і 15 приводяться в обертання від мотор-редуктора 2.

Основний ферментер обладнаний сорочкою 17, що складається із 6-8 ярусів-секцій. Площа поверхні охолодження сорочки - 60 м^2 , внутрішня частина якої складається із змійовиків 9, а об'єм апарату – 63 м^3 .

Ферментер розрахований на стерилізацію під температурою $130-140^\circ\text{C}$. Для забезпечення стерильності процесу передбачені торцеві ущільнення вала перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою торцевого ущільнення вдається практично повністю запобігти витоку середовища або потрапляння повітря у місці виводу вала [48].

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.1. Розрахунок виробничого ферментера.

4.1.1. Конструктивний розрахунок.

Вихідні дані для розрахунку:

Загальний об'єм апарату:

$$V_{\text{заг}} = 63 \text{ м}^3;$$

Коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,7$$

Робочий об'єм апарату розраховується за формулою:

$$V_p = V_{\text{заг}} \cdot K_3 = 63 \cdot 0,7 = 44,1 \text{ м}^3 \quad (4.1)$$

Було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). за ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами, Общие технические условия»[49]:

- Внутрішній діаметр апарата приймаємо $D_{\text{вн}} = 3600 \text{ мм} = 3,6 \text{ м}$;
- Висота корпусу $H = 5280 \text{ мм} = 5,28 \text{ м}$.

1. Розрахунок днища апарату.

Висоту еліптичної частини днища розраховуємо за формулою:

$$h_{\text{ел}} = 0,25D_{\text{вн}} = 0,25 \cdot 3600 = 900 \text{ мм} = 0,9 \text{ м} \quad (4.2)$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533-78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов, Основные размеры» [50] знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

- об'єм еліптичного днища: $V_{\text{дн}} = 7097,1 \text{ дм}^3 = 7,0971 \text{ м}^3$;
- товщина стінки еліптичного днища: $S_{\text{д}} = 70 \text{ мм} = 0,07 \text{ м}$;
- висота основи еліптичного днища: $h_1 = 0,12 \text{ м}$;
- внутрішня поверхня еліптичного днища $F_{\text{вн}} = 15,4 \text{ м}^2$.

Повна висота днища апарату :

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{ел}} = 0,12 + 0,9 = 1,02 \text{ м} \quad (4.3)$$

2. Розрахунок висоти рівня рідини в апараті.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Об'єм циліндричної частини ферментера:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{заг}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 63 - 2 \cdot 7,097 = 57,9 \text{ м}^3 \quad (4.4)$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F_{\text{вн}}} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{57,9 \cdot 4}{3,14 \cdot 3,6^2} = 5,69 \text{ м} \quad (4.5)$$

Висота апарату без штуцерів:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 5,69 + 2 \cdot 1,02 = 7,73 \text{ м} \quad (4.6)$$

Висоту рівня рідини в апараті знаходять за формулою:

$$H_{\text{р}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi D_{\text{вн}}} + h_{\text{дн}} = \frac{4(44,1 - 7,097)}{3,14 \cdot 3,6} + 1,02 = 14,11 \text{ м} \quad (4.7)$$

3. Розрахунок перемішуючого пристрою

Для перемішування культурального середовища в ферментері передбачено перемішувачий пристрій – лопатеву мішалку. Діаметр перемішуючого пристрою ($d_{\text{м}}$) визначається за співвідношенням $D_{\text{вн}}/d_{\text{м}}$, яке має бути у діапазоні 1,1-1,33 для лопатевої мішалки. Отже, розрахунковий діаметр перемішуючого пристрою:

$$d_{\text{м}} = \frac{D_{\text{вн}}}{1,33} = \frac{3600}{1,33} = 2706 \text{ мм} \quad (4.8)$$

Зі стандартного ряду [51] обираємо мішалку діаметром $d_{\text{м}} = 2800 \text{ мм} = 2,8 \text{ м}$.

У подальшому розрахунку повинні зберігатись такі основні параметри:
 $h_{\text{м}}/d_{\text{м}} = 1$; $b/d_{\text{м}} = 0,1$; $\xi_{\text{м}} = 1,28$.

Висота перемішуючого пристрою:

$$h_{\text{м}} = d_{\text{м}} = 2800 \text{ мм} = 2,8 \text{ м} \quad (4.9)$$

Ширина лопаті перемішуючого пристрою:

$$b = d_{\text{м}} \cdot 0,1 = 2800 \cdot 0,1 = 280 \text{ мм} = 0,28 \text{ м}$$

Параметр висоти завантаження γ апарату визначають за формулою:

$$\gamma = 8 \frac{H_{\text{р}}}{D_{\text{вн}}} + 1 = 8 \cdot \frac{14,11}{3,6} + 1 = 32 \quad (4.10)$$

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4. Розрахунок барботера

Висота перемішуючого пристрою над барботером становить:

$$h_6 = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 2,8 = 0,7 \text{ м} \quad (4.11)$$

Діаметр барботера [51]:

$$D_6 = D_0 d_m = 0,5 \cdot 2,8 = 1,4 \text{ м} \quad (4.12)$$

де $D_0 = 0,5 \div 0,75$.

Кількість отворів в барботері:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_r}{\pi d_0^2 W_0} = \frac{4 \cdot 0,1099}{3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 20} = 280 \text{ отворів} \quad (4.13)$$

де d_0 – діаметр отворів барботера (приймаємо $d_0 = 0,005$ м); V_r – ($V_r = 0,1099$ м³/с), W_0 – швидкість газу на виході з отворів барботера (приймаємо $W_0 = 20$ м/с).

Кількість отворів в одному ряду становить:

$$z_{\text{отв1}} = \frac{\pi D_0}{t_{\text{отв}}} = \frac{3,14 \cdot 0,75}{0,01} = 236 \text{ отворів} \quad (4.14)$$

де $t_{\text{отв}}$ – відстань між отворами (приймаємо $t_{\text{отв}} = 0,01$ м).

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} d_0^2 \cdot z_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,005^2 \cdot 280 = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \quad (4.15)$$

Для подачі повітря для виробничого культивування та забезпечення додаткового перемішування культурального середовища в реакторі встановлено барботер. Подача повітря встановлюється на рівні 1 дм³ /хв. Барботування проводиться протягом 24 годин. Маса повітря, що використовується на 1 реактор складає 60 кг/год, що входить до «інтенсивної продувки» і є раціональним значення для культивування обраного штаму. Загальна швидкість пропускання повітря ($Q_{\text{бп}}$) складає:

$$Q_{\text{бп}} = N \cdot 1 \cdot 24 \cdot 60 = 529920 \text{ дм}^3 / \text{добу} \quad (4.16)$$

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.1.2. Розрахунок виробничої потужності.

Згідно з невеликих об'ємів підприємства та відносно новітньої та невідомої на ринку технологією отримання ліпідів пропонується проект виробництва біодизелю в обсязі 100 000 дм³/рік.

Тривалість виготовлення партії, виходячи з найдовшої стадії виробництва, а саме культивування дріжджів *Yarrowia lipolytica* у ферментері, становить 6 діб. При безперервному режимі роботи підприємства, враховуючи 30 днів на зупинки, ремонти, очищення обладнання і т.д. та партійність виробництва, проектна продуктивність праці підприємства:

$$Q_{\text{пр}} = \frac{V}{T} \cdot t = \frac{100\,000}{335} \cdot 6 = 1719 \text{ дм}^3/\text{партія} \quad (4.17)$$

де $Q_{\text{пр}}$ – проектна продуктивність праці підприємства, V – загальна запланована потужність підприємства на рік, T – тривалість календарного року; t – час культивування.

Продуктивність виробництва за 1 день:

$$Q_1 = \frac{Q_{\text{пр}}}{t} = \frac{1719}{6} = 299 \text{ дм}^3/\text{день} \quad (4.18)$$

Для ферментерів номінальним об'ємом 63 м³, що використовуються на виробництві при обраному режимі роботи партійна продуктивність складає 37,8 м³ культуральної рідини на партію.

Для стандартної технології одержання біодизелю з ліпідів коефіцієнт перерахунку ліпідів на метилові естери жирних кислот складає 95%. Кількість ліпідів, що необхідна для виробництва такої кількості біодизелю:

$$m_{\text{ліп}} = \frac{m_{\text{бд}}}{w_{\text{ліп} \rightarrow \text{бд}}} = \frac{299}{0,95} = 315 \text{ кг} \quad (4.19)$$

де $m_{\text{ліп}}$ – маса ліпідної фракції, кг; $m_{\text{бд}}$ – маса біодизелю яку необхідно одержати, кг; $w_{\text{ліп} \rightarrow \text{бд}}$ – відсоток переходу ліпідів до естерів. За запропонованою технологією культивування вміст ліпідів складає 51%.

Тому кількість біомаси, яку необхідно наростити складає:

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$m_{\text{бм}} = \frac{m_{\text{ліп}}}{w_{\text{бм} \rightarrow \text{бд}}} = \frac{315}{0,51} = 617 \text{ кг} \quad (4.20)$$

де $m_{\text{бм}}$ – суха біомаса дріжджів, кг; $m_{\text{ліп}}$ – маса ліпідів, яку необхідно одержати, кг; $w_{\text{бм} \rightarrow \text{ліп}}$ – вміст ліпідів у біомасі *Yarrowia lipolytica*. Концентрація біомаси становить 2 кг/м³.

Загальний об'єм виробництва складає:

$$V_{\text{заг}} = m_{\text{бм}} / C_{\text{бм}} = 617 / 2 = 309 \text{ м}^3 \quad (4.21)$$

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Підвищення технічної оснащеності сучасних підприємств, застосування нових матеріалів, конструкцій і процесів, підвищення швидкостей і потужностей машин впливають на характер і частоту нещасних випадків і захворювань на виробництві. Закон «Про охорону праці» зобов'язує роботодавця створити задовільні умови на кожному робочому місці відповідно до нормативно-правових актів, а також забезпечити додержання вимог законодавства щодо прав працівників у галузі охорони праці [52].

Охорона праці й поліпшення умов праці є одним з найважливіших завдань. Безпечне ведення технологічного процесу знижує можливість травматизму, підвищує працездатність обслуговуючого персоналу. Установки повинні мати конструкцію, компоновку устаткування і трубопроводів, які забезпечують умови роботи обслуговуючого персоналу відповідно до діючих норм техніки безпеки і ергономіки. На персонал впливають такі фактори як: можливість ураження електричним струмом, шум, вміст газових домішок у повітрі, які можуть привести до вибуху та отруєння, біологічне ураження продуцентом.

Найбільш часті причини аварій устаткування, що працює під тиском, це невідповідність конструкції максимально допустимому тиску і температурі; втрата механічної міцності апарата (корозія, внутрішні дефекти металу, місцеві перегріву); невиконання встановленого режиму роботи; недостатня кваліфікація обслуговуючого персоналу; відсутність належного технічного нагляду. Вимоги безпеки, що пред'являються до конструкції, виготовлення, та експлуатації апаратів, що працюють під тиском, визначені «Правилами будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском».

Рівень шуму та вібрацій. Приміщення, в яких розміщена виробнича

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Демченко К.						
Конс..							68	81
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Зубченко Л.С.						
Затверд.								

лінія. Основними джерелами шуму при роботі вважаються електродвигуни, компресори та інше устаткування в яких шум може досягнути значення 90 дБА. Згідно норм ДСН 3.3.6.037-99 шум, при роботі, не повинен перевищувати значення в 80 дБА [53]. Заходи і матеріали, які застосовуються для пониження рівня шуму механічного походження включають:

- використання облицювального шумоізоляційного матеріалу з перфоруванням;
- звукоізоляція устаткування за допомогою глушників, резонаторів, кожухів, захисних конструкцій, тощо;
- застосування раціональних конструкцій, нових матеріалів і технологічних процесів.

Повітря робочої зони. Вентиляційна система має забезпечити виведення пилу (до 18 мкм) з приміщення і доведення якості повітря до встановлених норм. Для індивідуального захисту працівників від летких подразників застосовують респіратори, протигази, захисні костюми. Аеродинамічні випробування вентиляційних систем проводять не рідше одного разу на рік, а також після кожного капітального ремонту або реконструкції.

Якщо вентиляційна система не забезпечує належних умов і чистоти повітря у приміщеннях, то застосовують систему кондиціонування повітря. Необхідно забезпечити захист працівників від елементів устаткування, нагрітих до високих температур. Апарати повинні мати теплоізоляцію з мінеральної вати товщиною від 10 см, що забезпечить прийнятну температуру на поверхні барабана і теплове випромінювання відповідно до ДСН 3.3.6.042-99 [54]. Перед запуском технологічних апаратів необхідно провести промивку і продувку всіх комунікацій і устаткування, перевірити їх герметичність. Всі насоси, завантажувальні пристрої та інші механізми і машини перевіряють без навантаження і під навантаженням на інертних середовищах. Приміщення обладнанні стендами з зазначеними правилами техніки безпеки, правилами з експлуатації установки, стендами з планом евакуаційних виходів. Перед початком робіт працівники повинні проходити інструктаж з техніки безпеки.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Електробезпека. Приміщення операторної згідно ПУЕ-2017 відноситься до приміщень із підвищеною небезпекою, тому що можливий одночасний дотик людини до з'єднаних під землею технологічних апаратів і металевих корпусів електроустаткування [55].

Щоб уникнути ураження від статичної електрики робиться сітка з металевих пластин перетином 25×4 мм, що розташовується по периметру приміщення, і до якої приєднують мідним дротом $S = 10 \text{ мм}^2$ металеві частини апаратів й устаткування, які перебувають у цьому приміщенні. Для забезпечення безпечної роботи з електроустаткуванням кабелі та дроти вкладаються в труби й ховаються під підлогою, рубильники закриті в спеціальних шафах, при роботі з електроінструментами застосовуються індивідуальні засоби захисту.

При експлуатації електроустаткування необхідно дотримуватися наступних правил безпечної роботи:

- забороняється торкатися до електропроводів, робити ремонт електроустаткування, знімати й установлювати електролампи, запобіжники й інші деталі електроустаткування особам, які не мають права допуску;

- входити в розподільну щитову, відкривати електрозбірки, входити в місця, де висять таблички «Вхід заборонений», «Небезпечно для життя» й інші попереджувальні написи;

- перед проведенням ремонтних робіт на устаткуванні лінії електродвигуни повинні бути зупинені, знеструмлені й від'єднані від приводів, на пускових кнопках повинні бути вивішені плакати «Не вмикати, працюють люди». Відключення електроенергії проводиться електриком;

- відповідальний електрик за електрогосподарство лінії систематично перевіряє відповідність заземлення устаткування правилам технічної експлуатації, особливо після його ремонту;

- установлення плакатів і знаків безпеки.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Пожежна безпека. На лінії виробництва біодизеля горючими речовинами є: біодизель, метиловий спирт та мастило, яким змазуються частини конструкції.

Біодизель є вибухонебезпечним матеріалом, відноситься до горючих матеріалів, тому технологічний процес утилізації біодизеля відноситься до категорії В (ДСТУ Б В.1.1-36:2016) [56]. Згідно ПУЕ клас зони установки П-Па (зони, розташовані в приміщеннях, в яких зберігаються горючі речовини). Цех в якому знаходиться установка виробництва біодизеля будується з використанням негорючих матеріалів (бетону, залізобетону), тому стійкість споруди за ДБН В.1.1-7-2002 відповідає ступеню вогнестійкості II [57].

В разі виникнення пожежі встановлені датчики-сповіщувачі, які спрацьовують при підвищенні температури до 89°C. Для гасіння невеликих ділянок загорання при вимкненому та ввімкнутому електроустаткуванні застосовують вуглекислотні та порошкові вогнегасники.

Як стаціонарні засоби пожежогасіння встановлені самоспрацьовуючі вогнегасники. У приміщенні, де розташовується установка, на відстані 30 метрів один від одного встановлені пожежні гідранти з рукавами довжиною до 10 метрів. Відстань до пожежного виходу не більше 40 метрів.

Охорона навколишнього середовища. Заміна агресивних і канцерогенних екстрагентів ліпідів з біомаси, таких як формальдегід в суміші з метанолом, на систему надкритичної екстракції значно зменшує антропогенне навантаження на навколишнє середовище і попереджає можливий викид забруднюючих речовин.

Застосування біодизеля в традиційних дизельних двигунах значно знижує викиди в атмосферу вуглеводнів, оксиду вуглецю, сульфатів, ароматичних вуглеводнів і твердих частинок в порівнянні з нафтопродуктами. Крім того, і це особливо важливо, використання біодизеля скорочує кількість викидів в атмосферу токсичних і канцерогенних речовин. Використання чистого біодизеля (100%) може знизити ризик ракових захворювань на 94%.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

ВИСНОВКИ

В дипломному проекті розроблено технологію отримання ліпідів дріжджових грибів *Yarrowia lipolytica* з подальшим виробництвом біодизельного палива. Відповідно до поставлених завдань :

1. Проведено літературний огляд існуючих видів олеогенних дріжджів, що використовуються у біоенергетиці, технології виробництва біодизеля і можливість використання корисних побічних продуктів його виробництва. За проведеним оглядом літератури було обрано закриту систему культивування дріжджів виду *Yarrowia lipolytica* з використанням у якості джерела вуглецю промислового гліцеролу як побічного продукту виробництва біодизеля у виробничому ферментері барботажного типу з механічним перемішуванням.

2. Обґрунтовано та обрано раціональні режим, параметри та умови культивування дріжджів для отримання біодизеля. Культивування є одноступінчастим, відбувається у періодичному режимі у виробничому ферментері з підтриманням рівня $\text{pH}=6,0\pm0,3$ та температури $30\pm2^\circ\text{C}$.

3. Розраховано технічні показники та матеріальний баланс. Для забезпечення виробництва $100\,000\text{ дм}^3$ біодизеля на рік розраховано технічні параметри ферментера барботажного типу з механічним перемішуванням загальним об'ємом $V_{\text{заг}}=63\text{ м}^3$ і коефіцієнтом заповнення 0,7.

4. Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва ліпідів з дріжджів *Yarrowia lipolytica*. Запропонована технологія включає стадії підготовки поживного середовища для культивування дріжджів, виробничий біосинтез ліпідів дріжджових грибів, виділення ліпідів з дріжджових клітин, виробництво біодизеля та його очищення. Розроблено креслення ферментера.

5. Запропоновано заходи щодо забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля, згідно до ДСТУ та ДБН.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Демченко К.			ВИСНОВКИ		Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..								72	81
Реценз.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ					
Керівн.		Зубченко Л.С.							
Затверд.									

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Daroch M. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks / M. Daroch, S. Geng, G. Wang. // Appl. Energy. – 2013. – №102. – С. 1371–1381.
2. Singh M. Direct organogenesis of pongamia pinnata (L.) pierre from cotyledonary segments: a valuable biodiesel tree / M. Singh, J. Jatoliya, V. Saharan. // Cell Tissue Res. – 2016. – №16. – С. 5399–5404.
3. Niehus X. Evaluation of *Yarrowia lipolytica* Oil for Biodiesel Production: Land Use Oil Yield, Carbon, and Energy Balance / X. Niehus, L. Casas-Godoy, F. Rodriguez-Valadez. // Journal of Lipids. – 2018.
4. E. Feofilova. Biodiesel Fuel: Content, Production, Producers, Contemporary Biotechnology (Review) / E. Feofilova, Y. Sergeeva, A. Ivashechkin. // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2010. – №4. – С. 369–378.
5. A process model to estimate biodiesel production costs / M. J. Haas, J. McAloon, W. C. Yee, T. A. Foglia. // Bioresource Technology, vol. 97. – 2006. – №4. – С. 671–678.
6. Ratledge C. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms / C. Ratledge, J. P. Wynn. // Advances in Applied Microbiology. – 2002. – №51. – С. 1–52.
7. Kim J. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae / J. Kim, G. Yoo, H. Lee. // Biotechnology Advances. – 2013. – №31. – С. 862–876.
8. Gouveia L. Microalgae as a raw material for biofuel production / L. Gouveia, A. C. Oliveira. // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2009. – №36. – С. 269–274.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Демченко К.			ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	Літ.	Арк.	Аркушів
Конс..							73	81
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Керівн.		Зубченко Л.С.						
Затверд.								

9. Darvishi F. *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production / F. Darvishi, Z. Fathi, M. Ariana, H. Moradi. // Biochemical Engineering Journal. – 2017. – №127. – С. 87–96.
10. Enshaeieh M. Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts / M.Enshaeieh, A. Abdoli, I. Nahvi, M. Madani. // Journal of Biology and Today's World. – 2012. – №1. – С. 82–92.
11. Li Y.H. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides* / Y. H. Li, B. Liu, Z. B. Zhao, F. W. Bai. // Chinese Journal of Biotechnology. – 2006. – №4. – С. 650–656.
12. Rupčić J. Cell lipids of the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol / J. Rupčić, B. Blagović, V. Marić. // Journal of Chromatography A. – 1996. – №755. – С. 75–80.
13. Koutinas A. A. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production / A. A. Koutinas, A. Chatzifragkou, N. Kopsahelis, S. Papanikolaou. // Fuel. – 2014. – №116. – С. 566–577.
14. Gimpel J. A. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity / J. A. Gimpel, V. Henríquez, S. P. Mayfield. // Frontiers in Microbiology. – 2015. – №6.
15. Roostita R. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. / R. Roostita, G. H. Fleett. // International Journal of Food Microbiology. – 1996. – №28. – С. 393–404.
16. Flores M. Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages / M. Flores, S. Corral, L. Cano-García. // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – №64. – С. 16–24.
17. Hassanshahian M. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf / M. Hassanshahian, H. Tebyanian, S. Cappello. // Marine Pollution Bulletin. – 2012. – №64. – С. 1386–1391.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

18. Darvishi F. Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica* / Darvishi. – London: Springer, 2014. – 82 c.
19. Aarthy M. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview / M. Aarthy, P. Saravanan, M. Gowthaman. // Chemical Engineering Research and Design. – 2014. – №92. – C. 1591–1601.
20. Qiao K. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism / K. Qiao, T. M. Wasylenko, K. Zhou. // Nature Biotechnology. – 2017. – №35. – C. 173–177.
21. Duda K. Comparison of performance and emissions of a CRDI diesel engine fuelled with biodiesel of different origin / K. Duda, S. Wierzbicki, M. Smieja. // Fuel. – 2018. – №212. – C. 202–222.
22. Wagner J. M. Developing a piggyBac transposon system and compatible selection markers for insertional mutagenesis and genome engineering in *Yarrowia lipolytica* / J. M. Wagner, E. V. Williams, H. S. Alper. // Biotechnology J. – 2018. – №13.
23. Patterson K. Functional genomics for the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* / K. Patterson, J. Yu, J. Landberg. // Metabolic Engineering. – 2018. – №48. – C. 184–196.
24. Tai M. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production / M. Tai, G. Stephanopoulos. // Metabolic Engineering. – 2013. – №15. – C. 1–9.
25. Spagnuolo M. Oleaginous Yeast for Biofuel and Oleochemical Production / M. Spagnuolo, A. Yaguchi, M. Blenner. // Current Opinion in Biotechnology. – 2019. – №57. – C. 73–81.
26. Xie D. Integrating Cellular and Bioprocess Engineering in the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica* for Biodiesel Production: A Review / Xie.D // Frontiers of Bioengineering and Biotechnology. – 2017. – №5.
27. Venter T. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil / T. Venter, J. L. Kock, P. J. Botes. // Systematic and Applied Microbiology. – 2004. – №27. – C. 135–138.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

28. Sabra W. Substrates and oxygen dependent citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: insights through transcriptome and fluxome analysis / W. Sabra, R. R. Bommarreddy, G. Maheshwari. // Microbial Cell Factories. – 2017. – №16.
29. Xie D. Omega-3 Production by Fermentation of *Yarrowia lipolytica*: From Fed-Batch to Continuous / D. Xie, E. Miller, P. Sharpe. // Biotechnology and Bioengineering. – 2017. – №144.
30. Egermeier M. Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol / M. Egermeier, H. Russmayer, M. Sauer. // Frontiers in Microbiology. – 2017. – №49.
31. Fontanille P. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* / P. Fontanille, V. Kumar, G. Christophe. // Bioresource Technology. – 2012. – №114. – C. 443–449.
32. Hackenschmidt S. Characterization of three *Yarrowia lipolytica* strains in respect to different cultivation temperatures and metabolite secretion [Електронний ресурс] / S. Hackenschmidt, F. Bracharz, R. Daniel. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/05/23/645242.full.pdf>.
33. Ferrante G. Influence of temperature and growth phase on desaturase activity of the mesophilic yeast *Candida lipolytica* / G. Ferrante, Y. Ohno, M. Kates. // Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 1983. – №61. – C. 171–177.
34. Drévillon L. Lipid extraction from *Yarrowia lipolytica* biomass using high-pressure homogenization / L. Drévillon, M. Koubaa, E. Vorobiev. // Biomass and Bioenergy. – 2018. – №115. – C. 143–150.
35. Ageitos J. Oily yeasts as oleaginous cell factories / J. Ageitos, J. Vallejo. // Applied Microbiolpgy and Biotechnology. – 2011. – №90.
36. Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast / L.Drévillon, M. Koubaa, J. Nicaud, E. Vorobiev. // Biomass and Bioenergy. – 2019. – №128.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

37. Patel A. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses / A. Patel, N. Arora, K. Sartaj. // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2016. – №62. – С. 836–855.

38. Chemat F. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. / F. Chemat, Z. Huma, M. K. Khan. // Ultrasonics Sonochemistry. – 2011. – №18. – С. 813–835.

39. Shynkaryk M. V. Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) / M. V. Shynkaryk, N. I. Lebovka, J. Lanoisellé. // Journal of Food Engineering. – 2009. – №92. – С. 189–195.

40. Delsart C. Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics / C. Delsart, N. Grimi, N. Boussetta. // Journal of Applied Microbiology. – 2016. – №120. – С. 152–164.

41. Hussain Z. Lipid profiling and corresponding biodiesel quality of *Mortierella isabellina* using different drying and extraction methods / Z. Hussain, J. Ruan, I. A. Nascimento. // Bioresource Technology. – 2014. – №169. – С. 768–772.

42. Nielsen P. M. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations / P. M. Nielsen, J. Brask, L. Fjerbaek. // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2008. – №110. – С. 692–700.

43. Fukuda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils / H. Fukuda, K. Kondo, H. Noda. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2001. – №92. – С. 405–416.

44. Fukuda R. Metabolism of hydrophobic carbon sources and regulation of it in n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica* / Fukuda. // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2013. – №77. – С. 1149–1154.

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

45. Xu P. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals / Xu P. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2016. – №113.

46. Demirbas A. Biodiesel A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines / Demirbas A. – London: Springer, 2008. – 213 с.

47. Быков В. А. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В. Д. Быков, И. А. Крылов, М. Н. Манаков и др. // Москва: Высш. шк., 1987. – 143 с.

48. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. /Елинов. – Санкт-Петербург:"Наука", 1995. – 600 с.

49. ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами, Общие технические условия»

50. ГОСТ 6533-78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов, Основные размеры»

51. Дытнерский Ю. И. Основные процессы и аппараты химической технологии. Пособие по проектированию. изд 2-е, пер. и доп./ Москва: Химия, 1991. – 493с.

52. Закон «Про охорону праці» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12>

53. ДСН 3.3.6.037-99 «Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://arm.te.ua/docs/DSN-3.3.6.037-99.pdf>

54. ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://zakon2.rada.gov.ua/rada/show/va042282-99>

55. Правила улаштування електроустановок [Електронний ресурс]. – 2017. – Режим доступу до ресурсу: <https://ua.energy/wpcontent/uploads/2018/06/%D0%9F%D0%A3%D0%95.pdf>

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

56. ДСТУ Б В.1.1-36:2016 «Визначення категорій приміщень, будинків та зовнішніх установок за вибухопожежною та пожежною небезпекою» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=65419

57. ДБН В.1.1-7-2002 «Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/docpage.html?id_doc=68456

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ

Додаток А

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Маса, кг	Примітка
Н-1, Н-4, Н-12, Н-10, Н-21, Н-17, Н-45, Н-48, Н-54	Насос відцентровий горизонтальний консольний з робочим колесом закритого типу	9		Збірний
Ф-2, Ф-3, Ф-5, Ф-6, Ф-7, Ф-8, Ф-11, Ф-13, Ф-14, Ф-19, Ф-20	Фільтри установки зворотного осмосу ВодИнТех-М (Росія) з продуктивністю 40 м³/год, потужністю до 45 кВт	11		
Пз-21	Повітрозабірник, висота 5 м.	1		
К-22	Компресор.	1		
Х-23	Холодильник. Теплообмінник- охолоджувач (нагрівач) MHI SAF-DX1000E6.	1		
Р-24	Ресивер.	1		
Ф-25	Головний фільтр TRION Forever Filter®. Ефективність очистки 98%	1		Збірний
Ф-26	Індивідуальний фільтр HEPA MAC 10 IQ.	1		Збірний
Д-27, Д-28, Д-30, Д-31, Д-33, Д-34, Д-36, Д-37, Д-42, Д-55, Д-58	Об'ємно-ваговий дозатор	12		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
З-29, З-32, З-35, З-38, З-56, З-59	Реактор-змішувач з турбінними мішалками VMP-680	6		Неірж. сталь 12Х18Н10Т

					ЕКБ.БЕ6107. ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Демченко К.				Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Аркушів	
Конс..									80	81	
Реценз.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ							
Керівн.	Зубченко Л.С.										
Затверд.											

A-39	Автоклав Sterivar HP 9621-2, температура 105-134°C,	1		
I-41	Інокулятор з трьохлопатевою мішалкою та кільцевим барботером	1		Збірний
ФВ-43	Ферментер виробничий об'ємом 63 м ³ , з лопатевою та барботером продуктивністю 60 кг/год	1		Збірний
ЗБ-9, ЗБ-16, ЗБ-43, ЗБ-57, ЗБ-60	Збірник для тиску рівного або вищого за атмосферний	5		Неірж. сталь 12Х18Н10Т
Г-47	Гомогенізатор високого тиску EA Niro Soavi PandaPlus 2000, діапазон тисків 5-15 МПа	1		
ФП-49	Фільтр-прес Hbracol 200, (400). Площа фільтрації 1 пластини 400 см ² , продуктивність 7 м ³ /хв	1		Збірний
ЛС-50	Ліофільна сушарка Nordeх, діапазон температур -5-+25°C	1		Збірний
Е-52	Екстрактор-сепаратор «Лувеста» типу EH10007	1		
СП-53	Сепаратор для тиску рівного або вищого за атмосферний	1		Неірж. сталь 12Х18Н10Т